



ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE LA CUANTIFICACIÓN DE ARN Y ADN PLASMÁTICOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE LARINGE E HIPOFARINGE

Memoria de José Diego Contreras Sánchez para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía.

Directores de tesis

Dra. Dolores C. García Olmo

Prof. Dr. Damián García Olmo

Este trabajo está dedicado

A los que sufren esta terrible enfermedad. A sus familias.

A mis pacientes.

*A mi abuela Dolores, a la que escucho todos los días en mi corazón,
dándome consejos.*

A mis padres, Isidro y Dolores, a quienes debo todo.

A Inma, luz de mi vida.

A mis hijos, Álvaro y Celia, mi esperanza.

ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE LA CUANTIFICACIÓN DE ARN Y ADN PLASMÁTICOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE LARINGE E HIPOFARINGE.

TESIS DOCTORAL

DOCTORANDO: JOSE DIEGO CONTRERAS SÁNCHEZ

DIRECTORES: DRA. DOLORES C. GARCÍA OLMO Y PROF. DR. DAMIÁN GARCÍA OLMO.

COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE ALBACETE.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

RESUMEN

Hasta ahora han sido escasos los estudios que han tratado la utilidad clínica de la detección y análisis de ARN y ADN circulantes en plasma en pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe, y además en la mayor parte de ellos se agrupan estos casos con los de otros tumores de cavidad oral (lo que se denomina tumores de cabeza y cuello). Los resultados han sido discrepantes entre autores (Coulet et al, 2000, Silva y Bonilla 2001 –carta al director-, Nawroz-Danish et al 2004) En cualquier caso, respecto al ADN tumoral plasmático, no se ha podido asociar su detección con parámetros tales como la recidiva, el estadio tumoral o la supervivencia (Nawroz-Danish et al 2008), y en lo que respecta a ADN total tampoco hemos encontrado referencias en las que se atribuya algún valor clínico. No obstante sería necesario valorar la cuantificación por otros métodos técnicamente más sofisticados (por ejemplo PCR cuantitativa en tiempo real) antes de descartar el uso de ADN plasmático como marcador tumoral en esta enfermedad.

El precedente más cercano a nuestro estudio es el de Li et al. (2005), realizado sobre una muestra de 34 pacientes con cáncer de laringe en el periodo perioperatorio, y en el que detectaron y cuantificaron ARNm de GAPDH y de hTERT, especialmente en tejidos.

Objetivos específicos:

Evaluar la utilidad de la cuantificación de ARN tumoral (hTERT ARNm) y no tumoral (GAPDH ARNm) en plasma como herramienta diagnóstica del carcinoma de laringe e hipofaringe.

Analizar la correlación entre los niveles de ARN plasmático y los distintos parámetros anatomoclínicos, estadio tumoral y presencia de metástasis linfáticas regionales cervicales y a distancia.

Valorar la evolución de los niveles de ARN plasmático, en el perioperatorio de la exéresis quirúrgica tumoral.

Analizar la correlación entre los niveles de ARN plasmático, y la evolución clínica y la supervivencia tras el tratamiento quirúrgico.

Objetivo secundario:

Valorar la evolución de los niveles de ADN total en plasma en el perioperatorio de la exéresis quirúrgica tumoral, y analizar su correlación con la evolución clínica y la supervivencia tras el tratamiento quirúrgico.

Grupo de estudio: 49 pacientes intervenidos por cáncer de laringe e hipofaringe, en el Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Grupo Control: voluntarios sanos sin enfermedad oncológica (n= 27).

Estudio transversal (caso-control) para establecer el valor diagnóstico de las determinaciones en plasma, y un estudio longitudinal de cohortes, para evaluar el valor pronóstico y predictivo de estas determinaciones.

Metodología: En cada paciente, y previamente a la intervención quirúrgica, se extrajo una muestra de sangre, y en el periodo postoperatorio se realizó una nueva extracción de sangre. Inmediatamente tras las extracciones se realizaron centrifugaciones para aislar el plasma. En ambas muestras de cada paciente se extrajo y cuantificó el ADN total libre, mediante espectrofotometría, y el ARNm de GAPDH y de la subunidad hTERT de la telomerasa mediante RT-PCR en tiempo real.

Previamente se cuantificó la expresión de ARNm de GAPDH y de hTERT en muestras de tumor y tejidos adyacentes, para comprobar la presencia de actividad telomerasa y ajustar las condiciones óptimas de reacción.

De los resultados del presente estudio se ha podido confirmar la detección de hTERT ARNm en la mayoría de las muestras de tumor, así como en gran parte de las muestras de tejidos adyacentes. Igualmente se ha podido confirmar la detección de

ARNm de GAPDH y de hTERT en el plasma de los pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe, y evaluar su valor diagnóstico, su relación con distintos parámetros anatomoclínicos y su valor pronóstico en relación con la recidiva, metástasis y supervivencia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Dolores C. García Olmo, modelo de calidad humana y rigor científico. Con su paciencia e infatigable labor en la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete ha sabido superar mis limitaciones para poder culminar este trabajo.

Al Prof. Dr. Damián García Olmo, que me abrió las puertas de esta Universidad, y me permitió cumplir un sueño.

A María Granada Picazo Martínez, por su brillante labor en las técnicas de PCR en el laboratorio.

Al Dr. Tomás G. Fernández de Sevilla y a mis compañeros del Servicio de Otorrinolaringología, por su cariño y apoyo durante la realización del presente trabajo.

A Ángel Arriaga y Teresa Nam, por su inestimable trabajo en la manipulación de los tejidos en el Biobanco.

Al Dr. Jesús López Torres por su inapreciable ayuda en el análisis estadístico.

A Teresa Martí, Vicenta Vives, Rosario Serrano, María Pilar García, Francisca Sánchez, Virginia Muñoz y Juan Gil Martínez, por su generosa ayuda en la extracción de muestras de sangre en la consulta y en el quirófano. Al Dr. Pedro Seguí y a la Dra. Shirley Pérez por su ayuda en la recogida de muestras.

A todos los pacientes que, sin escatimar molestias, participaron en este estudio. A sus familias. A todos los voluntarios que de forma altruista donaron sus muestras.

A la Asociación Contra el Cáncer de Elche de la Sierra (Albacete) ACCESI, por su generosa y callada labor en favor de la investigación.

Al Dr. Carlos Almodóvar, referente en mi vida personal y profesional, por sus consejos.

Al Dr. Fernando Cerván, médico maestro de médicos, por sus consejos en la realización de este trabajo.

A Inmaculada Pérez por su ayuda en la revisión del manuscrito, y a Álvaro Contreras por la confección de los gráficos.

A la Dra. Aránzazu Pérez, por sus consejos y sugerencias en la revisión del manuscrito.

A los doctores V. M. Hidalgo, C. Lafuente, G. Aldamiz, S. Beltrame y J. Trujillo, que me salvaron la vida durante la redacción de este trabajo, y a Carmen Cuéllar y Ana M. García, imprescindibles en mi recuperación.

Este trabajo se ha realizado en la Unidad de Investigación y el Servicio de Otorrinolaringología del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (Gerencia de Atención Integrada de Albacete). Para su desarrollo, se ha contado con financiación de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (FISCAM, proyecto nº expediente: PI-2008/26), y de la Asociación Contra el Cáncer de Elche de la Sierra (ACCESI, Albacete).

INDICE DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

abl: gen del cromosoma 9.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

[ADN]: Concentración plasmática de ácido desoxirribonucleico.

ADNasas: Nucleasas de ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ADNg: Ácido desoxirribonucleico genómico.

ADNmi: Micro-ácido desoxirribonucleico.

ADNmit: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

AJCC: American Joint Committee on Cancer.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNasas: Nucleasas de ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNmi: Micro-ácido ribonucleico.

bcr: Gen del cromosoma 22.

CEA: Antígeno carcinoembrionario.

cfADN: Ácido desoxirribonucleico libre circulante.

cfARN: Ácido ribonucleico libre circulante.

CHUA: Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

CNA: (*Circulating nucleic acids* en inglés) Ácidos nucleicos circulantes.

cTNM: Estadificación clínica del tumor.

CYFRA: Anticuerpo monoclonal que reconoce un fragmento de citoqueratina.

DHFR: Dihidrofolato reductasa.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EGFR ARNm: Ácido ribonucleico mensajero del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

[GAPDH]: Concentración de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en plasma.

GAR1: Proteína asociada a la telomerasa.

hTERT: (*Human telomerase reverse transcriptase* en inglés) Transcriptasa inversa de la telomerasa humana.

hTERT ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario de la telomerasa.

hTERT ARNm: Ácido ribonucleico mensajero de la telomerasa.

hTR: (*Human telomerase RNA* en inglés) Ácido ribonucleico de la telomerasa humana.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LES: Lupus eritematoso sistémico.

N+: Presencia de metástasis en los ganglios cervicales.

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida y adenina.

NAP57: Proteína asociada a la telomerasa.

NHP2: Proteína asociada a la telomerasa.

NOP10: Proteína asociada a la telomerasa.

NSE: Enolasa neuroespecífica.

ORL: Otorrinolaringología.

PAAF: Punción-aspiración con aguja fina.

pb: Pares de bases.

PBGD: Porfobilinógeno deaminasa.

PCR: (*Polymerase Chain Reaction* en inglés) Reacción en cadena de la polimerasa.

PNA: (*Peptic nucleic acid* en inglés) Polímero sintético similar a ADN o ARN.

[PreQ-ADN]: Concentración de ADN en la muestra de plasma preoperatoria.

[PreQ-GAPDH]: Concentración de GAPDH ARNm en la muestra de plasma preoperatoria.

[preQ-hTERT]: Concentración de hTERT ARNm en la muestra de plasma preoperatoria.

[PostQ-ADN]: Concentración de ADN en la muestra de plasma postoperatoria.

[PostQ-GAPDH]: Concentración de GAPDH ARNm en la muestra de plasma postoperatoria.

[PostQ-hTERT]: Concentración de hTERT ARNm en la muestra de plasma postoperatoria.

PSA: Antígeno prostático específico.

pTNM: Estadificación tumoral patológica.

RIA: Radioinmunoanálisis.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RT-PCR: (*Reverse transcription polymerase chain reaction* en inglés) Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

SCC-Ag ARNm: Ácido ribonucleico mensajero del antígeno de células escamosas.

TAC: Tomografía axial computerizada.

TRAP: (*Telomere repeat amplification protocol* en inglés) Protocolo de amplificación de la repetición telomérica.

INDICE DE TABLAS

Tabla I: Clasificación TNM del cáncer de laringe e hipofaringe, según AJCC.

Tabla II: Clasificación del estadio tumoral del cáncer de laringe e hipofaringe, según AJCC.

Tabla III: Secuencia de los cebadores y de la sonda Taqman utilizados para la amplificación del ADNc de la subunidad hTERT de la telomerasa y de la GAPDH.

Tabla IV: Resumen de los principales datos demográficos y anatomoclínicos de los pacientes con cáncer reclutados en este estudio.

Tabla V: Detección de ARNm de hTERT y de GAPDH en muestras de tejidos.

Tabla VI: Detección de hTERT ARNm en el plasma de pacientes con cáncer y voluntarios sanos.

Tabla VII: Niveles plasmáticos de hTERT ARNm en pacientes con cáncer.

Tabla VIII: Niveles plasmáticos de GAPDH ARNm en pacientes con cáncer y voluntarios sanos.

Tabla IX: Niveles plasmáticos de ADN en pacientes con cáncer.

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Carcinoma escamoso de laringe supraglótico. Pieza quirúrgica de laringectomía total.

Fig. 2: Carcinoma escamoso de laringe. Corte microscópico. Tinción de hematoxilina-eosina.

Fig. 3: Metástasis cervical por carcinoma supraglótico. TAC cervical. Corte axial con contraste.

Fig. 4: Número de publicaciones sobre ácidos nucleicos libres circulantes en plasma y cáncer en las últimas décadas.

Fig. 5: Dos modelos de liberación de ADN en la sangre.

Fig. 6: Origen del ADN libre circulante y las metástasis en el cáncer.

Fig. 7: Localización de los telómeros en los extremos de los cromosomas.

Fig. 8: Mecanismo de acción de la telomerasa.

Fig. 9: Laboratorio de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA).

Fig. 10: Patrón de temperaturas empleado en la amplificación del ADNc de hTERT.

Fig. 11: Sistema LightCycler.

Fig. 12: Sistema NanoDrop.

Fig. 13: Curvas estándar.

Fig.14: Patrón de temperaturas empleado en la amplificación del ADNc de GAPDH.

Fig. 15: Distribución por sexo de los pacientes con cáncer y voluntarios sanos.

Fig. 16: Localización del tumor dentro de la vía aerodigestiva superior.

Fig. 17: Porcentaje de pacientes con antecedentes de neoplasia maligna previa.

Fig. 18:. Distribución de los pacientes según el grado tumoral T.

Fig. 19: Distribución de los pacientes según el grado tumoral N.

Fig. 20: Distribución de los pacientes según el estadio tumoral.

Fig. 21: Distribución de los pacientes según la técnica quirúrgica empleada.

Fig. 22: Porcentaje de pacientes en que se realizó vaciamiento cervical.

Fig. 23: Porcentaje de pacientes en que se añadió radioterapia y/o quimioterapia.

Fig. 24: Porcentaje de pacientes en que apareció recidiva local y/o regional durante el seguimiento.

Fig. 25: Porcentaje de pacientes en que aparecieron metástasis a distancia durante el seguimiento.

Fig. 26: Porcentaje de pacientes en que apareció un segundo tumor durante el seguimiento.

Fig. 27: Curva ROC. Valor diagnóstico de la detección de hTERT ARNm en la muestra de plasma preoperatoria de los pacientes con cáncer.

Fig. 28: Curva de supervivencia de los pacientes con cáncer en que se detectó hTERT ARNm, y cuya muestra de plasma fue extraída en el periodo postoperatorio tardío (entre 58 y 223 días).

Fig. 29: Curva de supervivencia de los pacientes en los que se detectó hTERT ARNm en la muestra de plasma postoperatoria.

Fig. 30: Tiempo (en días), para cada paciente con cáncer, entre la muestra de plasma preoperatoria y la muestra de plasma postoperatoria.

INDICE DE ANEXOS

Anexo I: Formulario de consentimiento informado para donación de muestras biológicas para el Biobanco y participación en el presente estudio.

Anexo II: Datos demográficos y anatomoclínicos de los pacientes con cáncer.

Anexo III: Resultados de los análisis moleculares en el plasma de los pacientes con cáncer.

Anexo IV: Datos demográficos y resultados de los análisis moleculares en el plasma del grupo control.

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Cáncer de laringe. Aspectos generales.....	3
1.1.1 Epidemiología.....	3
1.1.2 Características clínicas e histopatológicas. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento.....	5
1.1.3 Origen del cáncer de laringe.....	9
1.1.4 Marcadores tumorales.....	9
1.2 Ácidos nucleicos circulantes en el plasma y cáncer.....	11
1.2.1 Origen de los ácidos nucleicos circulantes.....	11
1.2.2 Valor clínico del ADN libre circulante.....	18
1.2.3 Valor clínico del ARN libre circulante.....	20
1.2.4 Ácidos nucleicos circulantes en plasma y cáncer de laringe.....	23
1.3 Cáncer y actividad telomerasa.....	24
1.3.1 Generalidades.....	24
1.3.2 Actividad telomerasa en tumores.....	29
1.3.3 Actividad telomerasa en el cáncer de laringe.....	30
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	33
2.1 Objetivo general.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
2.3 Objetivo secundario.....	35
2.4 Hipótesis.....	36
2.4.1 Hipótesis conceptual.....	36
2.4.2 Hipótesis operativas.....	36
2.4.3 Hipótesis estadísticas.....	36
III. MATERIALES Y MÉTODO.....	37
3.1 Sujetos de estudio.....	39
3.2 Diseño del estudio.....	39

3.3 Manejo de los pacientes con cáncer: diagnóstico, tratamiento y seguimiento.....	40
3.4. Recogida y procesamiento de las muestras.....	44
3.4.1 Recogida de muestras sanguíneas y de tejidos.....	44
3.4.2 Procesamiento inicial de las muestras de sangre y aislamiento del plasma.....	46
3.4.3 Extracción de ARN plasmático.....	47
3.4.4 Extracción de ARN de tejidos.....	47
3.4.5 Extracción y cuantificación de ADN plasmático.....	48
3.4.6 Detección de hTERT ARNm en tejidos.....	48
3.4.7 Detección y cuantificación de hTERT ARNm en plasma.....	52
3.4.8 Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en tejidos y plasma.....	53
3.5 Análisis estadístico.....	54
3.5.1 Base de datos.....	54
3.5.2 Variables.....	55
3.5.3 Análisis estadísticos.....	56
3.6 Consideraciones éticas.....	57
IV. RESULTADOS.....	59
4.1 Variables clínicas.....	61
4.2 Detección de hTERT ARNm y GAPDH ARNm en tejidos.....	69
4.3 Detección y cuantificación de hTERT ARNm en plasma.....	69
4.3.1 Detección y cuantificación de hTERT ARNm en muestras preoperatorias de plasma.....	70
4.3.2 Detección y cuantificación de hTERT ARNm en muestras postoperatorias de plasma.....	73
4.4 Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en plasma.....	74
4.4.1 Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en las muestras preoperatorias de plasma.....	74
4.4.2 Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en las muestras postoperatorias de plasma.....	75

4.5 Cuantificación de ADN en plasma.....	76
4.6 Análisis estadístico específico para la supervivencia.....	78
V. DISCUSIÓN.....	81
5.1 Técnicas elegidas para el estudio de los ácidos nucleicos plasmáticos en el cáncer de laringe e hipofaringe.....	83
5.1.1 Técnicas para la detección y cuantificación de ARN circulante total y tumoral.....	83
5.1.2 Fluorimetría para la detección de ADN total.....	86
5.2 Expresión de GAPDH y hTERT para la cuantificación del ARNm.....	87
5.3 Utilidad de los ácidos nucleicos circulantes para el diagnóstico y estadificación de los tumores de laringe e hipofaringe.....	91
5.3.1 Utilidad de la cuantificación de los genes sobreexpresados en tumores.....	91
5.3.2 Utilidad de la cuantificación de la expresión de los genes constitutivos.....	97
5.3.3 Utilidad de la cuantificación de ADN total.....	103
5.4 Efecto de la cirugía de los tumores laringofaríngeos sobre los niveles de ácidos nucleicos plasmáticos.....	106
5.4.1 Efecto de la cirugía sobre los niveles plasmáticos de genes sobreexpresados en tumores.....	107
5.4.2 Efecto de la cirugía sobre los niveles plasmáticos de genes Constitutivos.....	109
5.4.3 Efecto de la cirugía sobre los niveles de ADN total.....	110
5.5 Valor pronóstico de los ácidos nucleicos libres plasmáticos en el cáncer de laringe e hipofaringe.....	112
5.5.1 Valor pronóstico de la cuantificación de los genes sobreexpresados en tumores.....	112
5.5.2 Valor pronóstico de la cuantificación de la expresión de los genes constitutivos.....	115
5.5.3 Valor pronóstico de la cuantificación de ADN total en plasma.....	116
VI. CONCLUSIONES.....	119
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	123
VIII. ANEXOS.....	143

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer de laringe. Aspectos generales

1.1.1 Epidemiología

El cáncer de cabeza y cuello consiste en un grupo de enfermedades malignas que aparecen en la vía aerodigestiva superior, e incluye entre otros el cáncer de faringe y laringe (1). Este grupo sumó un total aproximado de 690.000 casos en todo el mundo en el año 2012, lo que constituye un 4,9% de la incidencia total del cáncer (2). El cáncer de laringe es una de las enfermedades malignas más frecuentes de cabeza y cuello, representando aproximadamente el 20% de los casos (3). Constituye el octavo tumor maligno en frecuencia en el mundo, con el 2% de nuevos casos diagnosticados anualmente, aunque con variaciones geográficas en su incidencia (4).

El consumo de tabaco es el principal factor de riesgo para el cáncer de laringe. Este riesgo aumenta con la duración del hábito tabáquico y con el número de cigarrillos (1), y es constatable tanto en los fumadores activos (7 veces más riesgo que en los no fumadores) como en los pasivos (5). El alcohol también es otro factor de riesgo conocido, y en no fumadores su consumo excesivo aumenta 2 veces la posibilidad de padecer esta enfermedad (6). La interacción de tabaco y alcohol parece tener un efecto sinérgico (7).

El cáncer de laringe se asocia a menudo al de hipofaringe. Mientras que el primero tiene una asociación más alta con el hábito de fumar, el de hipofaringe está fuertemente relacionado con el consumo de alcohol. Otros factores de riesgo, con menor grado de evidencia, implicados en la etiología del cáncer faringolaríngeo incluyen el reflujo gastroesofágico, la infección por virus del papiloma humano, una dieta pobre y la exposición a carcinógenos industriales como ácido sulfúrico, amianto, o productos metalúrgicos (8, 9).

El cáncer de laringe es más común en hombres que en mujeres (relación 7:1) y relativamente raro en la población menor de 40 años, aunque la incidencia se incrementa rápidamente después de los 50 años de edad (4, 10). No se conoce exactamente la causa de la diferencia de incidencia en ambos sexos. Algunos autores consideran que es debida a una menor exposición a los factores de riesgo en la población femenina, aunque también se han implicado diferencias genéticas y en el metabolismo de potenciales carcinógenos, que harían a la mujer menos susceptible al desarrollo de este tumor (11).

Las tasas de incidencia más altas en el cáncer de laringe han sido recogidas en el suroeste de Europa (España, Francia, Italia), este de Europa (Serbia, Polonia), Latinoamérica (Brasil, Argentina) y oeste de Asia (Pakistán, Turquía) (8).

En Europa se diagnostican alrededor de 52.000 nuevos casos por año. La incidencia observada en varones de la zona sur del continente es de 18 casos por 100.000 habitantes. En mujeres hasta el momento no supera los 1,5 casos por 100.000 habitantes (12).

En el año 2012, a nivel europeo, las tasas de incidencia en hombres variaron entre 1,4 por 100.000 en Islandia y 12,3 por 100.000 en Hungría, y en España ocupó una posición media-alta (tasa de 7,8 por 100.000). En mujeres, la tasa de España fue de 0,7 por 100.000 y ocupó una posición intermedia. En nuestro país se estima que en 2014 se diagnosticaron un total de 3.737 nuevos casos de cáncer de laringe, 3.442 en hombres y 295 en mujeres (13).

En el marco de los registros de cáncer en España también se observó una variabilidad importante. En el periodo 2003-2007, las tasas de incidencia de los hombres variaron entre 8,9 por 100.000 en Albacete y 13,1 por 100.000 en el País Vasco. En las mujeres entre 0,1 por 100.0

La supervivencia relativa a 5 años estandarizada por edad de los pacientes diagnosticados en el periodo 2000-2007 en Europa fue del 59%, tanto en hombres como en mujeres. En España fue de 59,5% en los hombres pero más elevada en las mujeres (69,2%) (15). Aunque la tendencia en la supervivencia del cáncer de laringe es variable según las regiones, en la mayoría de los países europeos y en los Estados Unidos se ha observado una ligera mejoría en los últimos años, sobre todo en los hombres, con una situación estable para las mujeres (2, 16, 17).

1.1.2 Características clínicas e histopatológicas. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento

El tipo histológico más frecuente del cáncer de laringe es el carcinoma escamoso o epidermoide, bien o moderadamente diferenciado (9), siendo dentro de este órgano las regiones supraglótica y glótica las más frecuentemente afectadas (18) (Figs. 1 y 2).



Fig. 1. Carcinoma escamoso de laringe supraglótico. Pieza quirúrgica de laringectomía total.

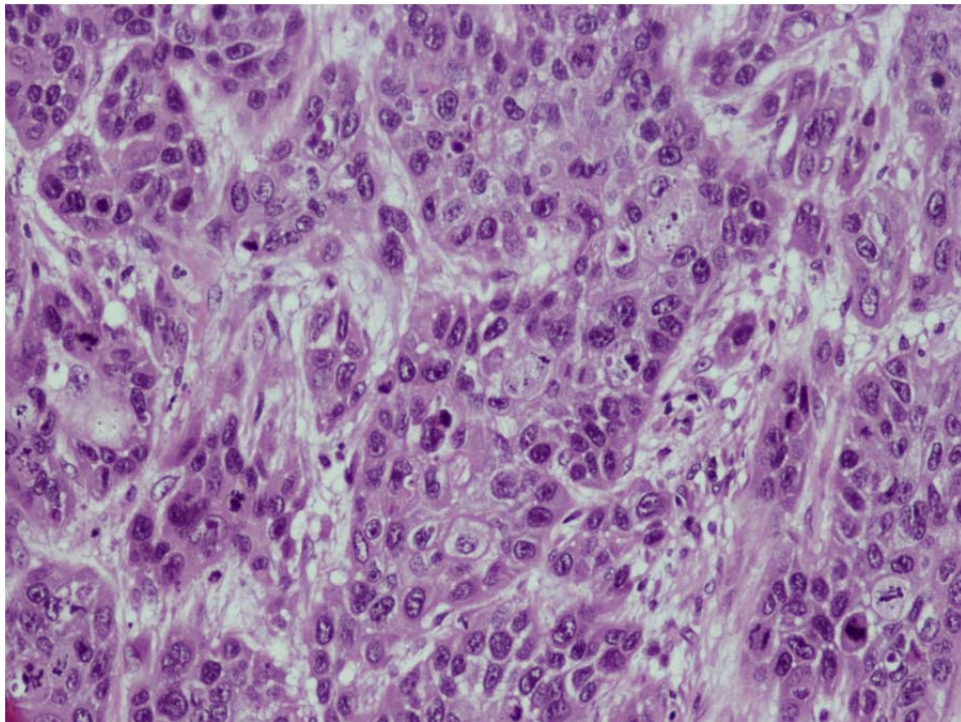


Fig. 2. Carcinoma escamoso de laringe. Corte microscópico. Tinción de hematoxilina-eosina.

Existe un comportamiento clínico y evolutivo distinto, según la localización del tumor dentro de la laringe, aunque en general se caracteriza por una agresiva invasión local y regional (a los ganglios linfáticos del cuello), recidivas locales y regionales, y posibilidad de multiplicidad tumoral en la vía aerodigestiva superior en un mismo paciente.

En los pacientes con enfermedad localizada, las recidivas locales o las metástasis regionales cervicales constituyen la principal causa de fracaso terapéutico, dado que las metástasis a distancia en el momento del diagnóstico son poco frecuentes (alrededor de un 15%) (19). La aparición de metástasis regionales secundarias y a distancia en la evolución de la enfermedad está directamente relacionada con la estado avanzado del tumor primario (especialmente T4), metástasis regionales (N+, especialmente N2 y N3) y localización tumoral (incidencia más alta en la hipofaringe comparada con regiones laríngeas como la glotis) (20).

Como se ha descrito, el cáncer de hipofaringe está etiopatogénica y anatómicamente relacionado con el de laringe. Además en ambos tumores se emplean los mismos medios diagnósticos y terapéuticos, por lo que es frecuente su estudio conjunto.

Ante un diagnóstico de cáncer de laringe, existe la posibilidad de un segundo tumor maligno sincrónico en el 7% de casos, y de un tumor metacrónico en el 22%, la mayoría de ellos localizados en las vías aerodigestivas superiores (55%), esófago (14%) y pulmón (16%), aunque puede ser difícil distinguir entre un cáncer primitivo bronquial y una metástasis única de un cáncer de la vía aerodigestiva superior (9).

Aunque existen distintas posibilidades de tratamiento, en nuestro país el cáncer de laringe se ha tratado clásicamente mediante la intervención quirúrgica. Los casos en estadios iniciales (I y II) se tratan habitualmente con cirugía parcial (mediante microcirugía endolaríngea láser o vía externa) con buenos resultados oncológicos y funcionales, aunque la radioterapia radical obtiene resultados similares. Los estadios avanzados (III y IV) requieren a menudo cirugía radical, que implica normalmente la laringectomía total, con importantes secuelas (traqueostoma definitivo, dificultades deglutorias y de comunicación, etc.). Además del manejo del tumor índice, en este tumor es necesario el tratamiento de las correspondientes áreas cervicales ganglionares con posibilidad de albergar metástasis regionales, a menudo bilateralmente, especialmente en los tumores supraglóticos y estadios avanzados.

El desarrollo, en los últimos años, de protocolos de preservación de órgano con el uso de radioterapia y quimioterapia concomitantes, ha permitido, en casos seleccionados, evitar un tratamiento quirúrgico mutilante, obteniendo resultados oncológicos similares a la intervención quirúrgica, aunque tampoco exentos de importantes secuelas (21, 22).

A pesar de los avances en el manejo del cáncer de laringe, y de cabeza y cuello en general, el pronóstico en los casos avanzados sigue siendo grave. En aproximadamente un 25% de los pacientes el cáncer se detecta cuando ya existen metástasis en los ganglios linfáticos regionales (19). En el cáncer de laringe, la presencia de metástasis en estos ganglios (Fig. 3) es el factor pronóstico más importante conocido, ya que se asocia con el doble de riesgo de metástasis a distancia, y la mitad de supervivencia a los 5 años. Asimismo, otro factor pronóstico importante es la presencia de difusión tumoral extracapsular en los ganglios linfáticos, que se relaciona con un mayor riesgo de metástasis a distancia y un empeoramiento de la supervivencia entre 3 y 9 veces (23).

La incidencia de metástasis ocultas, sobre todo regionales, es uno de los grandes problemas en el manejo del cáncer de laringe o hipofaringe. Las exploraciones clínicas y radiológicas periódicas no siempre tienen éxito en la detección de la enfermedad, lo que da lugar a un diagnóstico tardío, empeorando el pronóstico del paciente. El pulmón, hígado y hueso (costillas, vértebras, cráneo) constituyen las localizaciones más frecuentes de diseminación hematógena, mientras que la diseminación linfática a distancia más común aparece en el mediastino (20).

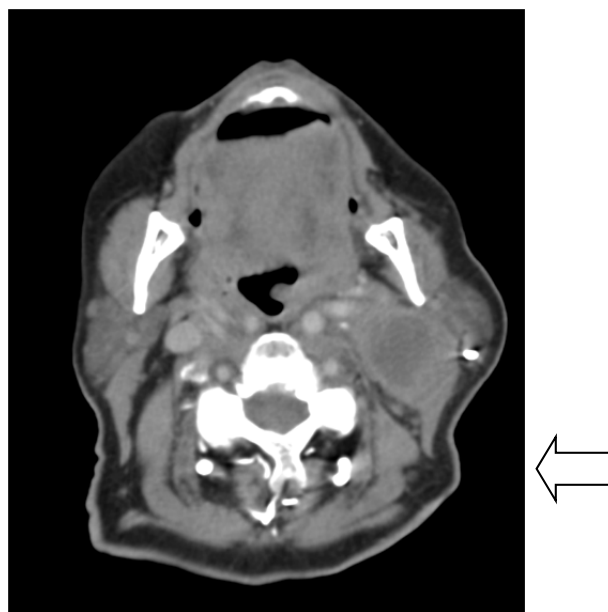


Fig. 3. Metástasis cervical por carcinoma supraglótico. TAC cervical. Corte axial con contraste.

1.1.3 Origen del cáncer de laringe

Se ha descrito que el carcinoma escamoso de laringe se desarrolla a partir de una población clonal de células que acumulan alteraciones genéticas, en un proceso secuencial de carcinogénesis laríngea (24). Se considera que son necesarios entre 6 y 10 sucesos genéticos independientes, en el que participan oncogenes y genes supresores, para el desarrollo de un cáncer invasivo (25).

En pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello, la desregulación de proto-oncogenes, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), debido a una amplificación génica o mutación puntual, se correlaciona con un fenotipo tumoral agresivo (estadío avanzado, con mal pronóstico) (26, 27). La pérdida de la región cromosómica 9p21 con la inactivación del gen p16, encontradas en el 80% de los cánceres de cabeza y cuello, ocurre tempranamente y puede ser detectada ya en la hiperplasia epitelial (25, 28). La pérdida de la función del gen p53, presente en el 50% de los cánceres de cabeza y cuello, probablemente ocurra en una fase posterior y promueva el desarrollo de lesiones preinvasivas e invasivas (25, 28). Además, la sobreexpresión del oncogen ciclina D1, encontrada en alrededor de 1/3 de carcinomas escamosos de esta localización, se asocia frecuentemente con el cáncer invasivo y se considera que representa un fenómeno tardío en la carcinogénesis laríngea (25, 28).

1.1.4 Marcadores tumorales

La detección del cáncer mediante un simple análisis de sangre es el sueño de cualquier investigador o clínico que trabajen en el manejo de esta enfermedad. Sin embargo, la naturaleza multifactorial de la oncogénesis y la heterogeneidad de sus vías hacen difícil apoyar el diagnóstico en un solo biomarcador.

Es bien conocido que distintos tumores secretan proteínas al torrente circulatorio, y son usadas de forma rutinaria como marcadores: PSA en el cáncer de próstata, alfa-fetoproteína en el hepatocarcinoma, antígeno carcinoembrionario (CEA) en el de colon, CA 15.3 en el de mama ó el CA 19.9 en los tumores pancreatobiliares (29). Pero no todos los tumores secretan proteínas que puedan ser usadas como biomarcadores. Además la utilidad clínica de estas sustancias para monitorizar el inicio, progresión y seguimiento del cáncer en general es relativamente limitada. La mayoría se han identificado en líneas celulares tumorales o en la biopsia de muestras de tumor en estadio invasivo o metastásico. Su identificación puede tener escasa sensibilidad en tumores no secretores, y además aparecer con resultado positivo en procesos inflamatorios o enfermedades benignas, limitando su especificidad (30).

Dentro de los tumores de cabeza y cuello, la identificación de biomarcadores tisulares constituye un gran desafío, debido a su naturaleza tumoral heterogénea, con aparición de neoplasias en una gran variedad de localizaciones en el tracto aerodigestivo superior, cada una de ellas con características histológicas y drenaje linfático distintos. Existen relativamente pocos marcadores que hayan demostrado su utilidad clínica (31). Entre los más utilizados se incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ciclina D1, Bcl-2 ("B-cell lymphoma 2), inhibidor de la kinasa ciclina-dependiente p27, factor de crecimiento endotelial vascular y p53. Sin embargo su papel en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad ha sido contradictorio. En un trabajo de revisión Lothaire *et al.* (2014) encontraron que las conclusiones sobre su pronóstico o valor predictivo por diferentes grupos investigadores no eran siempre consistentes (31, 32). Además, ninguno de los marcadores disponibles ha sido capaz de detectar este tipo de cáncer en estadios iniciales de la enfermedad (19).

Se puede decir que los instrumentos clínicos actuales para el diagnóstico y seguimiento en el cáncer de laringe son limitados y deficientes respecto al de otros procesos cancerosos, a pesar de que su incidencia en nuestro país es relativamente alta. Este tumor se diagnostica frecuentemente en un momento avanzado de la enfermedad (estadios III y IV), y a pesar de la instauración de tratamientos radicales, muy mutilantes para el paciente, no hay progresos significativos en las estadísticas de supervivencia. Además el estado anatomopatológico del tumor resecado y el grado de afectación de los ganglios cervicales son los principales factores empleados en la práctica clínica diaria para indicar un tratamiento adyuvante (radioterapia y/o quimioterapia), pero incluso los tumores en estadios iniciales pueden recidivar. Además, el establecimiento de los protocolos de preservación de órgano, evitando la cirugía radical mediante el uso de radioterapia y quimioterapia en distintos regímenes, supone grandes dificultades en el seguimiento de los pacientes. Tras un tratamiento de este tipo, con las técnicas de exploración e imagen disponibles actualmente, no siempre es fácil el diagnóstico de una posible persistencia tumoral o recidiva.

Por tanto, sería de gran interés contar con herramientas que ayudasen a detectar esta enfermedad en estados preneoplásicos o tempranos, así como contar con nuevos instrumentos con valor predictivo tras un tratamiento inicial, permitiendo la monitorización estrecha de la enfermedad.

1.2 Ácidos nucleicos circulantes en el plasma y cáncer

1.2.1 Origen de los ácidos nucleicos circulantes

El primer hallazgo de ácidos nucleicos circulantes (en la terminología anglosajona *circulating nucleic acids*, CNA) data de la década de 1940, cuando Mandel y Métais publicaron la presencia de estas moléculas libres en el plasma humano. Usando técnicas cuantitativas, estos autores detectaron ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) libres circulantes (cfADN y cfARN) en el plasma de sujetos sanos y enfermos (33). Sin embargo,

su estudio tuvo escasa repercusión hasta 1966, en que Tan *et al.* demostraron la presencia de ADN en el suero y plasma de pacientes afectados de lupus eritematoso sistémico (LES) (34). Más tarde Leon *et al.* (1977) detectaron niveles de ADN más altos en el suero de pacientes con enfermedad neoplásica que en sujetos sanos. Los niveles de ADN fueron cuantificados usando técnicas de inmunoensayo, basadas en anticuerpos anti-ADN obtenidos de pacientes con LES. Comparados con controles sanos, el 50% de los pacientes con cáncer presentaban niveles elevados de ADN. Estos niveles disminuían más del 90% cuando los pacientes respondían a la radioterapia, mientras que niveles persistentemente altos después del tratamiento se asociaban con peor pronóstico (35).

Algunos años más tarde Stroun *et al.* (1989) sugirieron, que al menos parte del ADN circulante en el suero o plasma, derivaba del tumor primario (36), pero esta hipótesis no fue confirmada hasta más tarde, cuando dos estudios casi paralelos describieron mutaciones *KRAS* en plasma de pacientes con neoplasias de páncreas y leucemia mieloide aguda (37, 38).

Posteriormente los estudios moleculares han mostrado evidencias de que las alteraciones genéticas detectadas en el ADN plasmático o sérico son las mismas que están presentes en el tumor: mutaciones en oncogenes, amplificación de oncogenes, inestabilidad de microsatélites, traslocaciones cromosómicas, alteraciones epigenéticas (ej. metilación aberrante) o incluso ADN vírico (39, 40), apoyando la idea del origen tumoral del cfADN y la posibilidad de usar las técnicas moleculares en su caracterización.

El crecimiento exponencial del número de publicaciones relacionadas con los CNA, especialmente en los últimos años (Fig. 4), demuestra el interés que ha despertado la identificación de estas sustancias en el estudio de la enfermedad neoplásica, dando lugar a numerosos estudios que fundamentalmente han confirmado este hecho, y han intentado asociarle valores diagnósticos,

pronósticos y de utilidad para la monitorización del proceso canceroso, especialmente tras la aplicación de terapias (41-44).

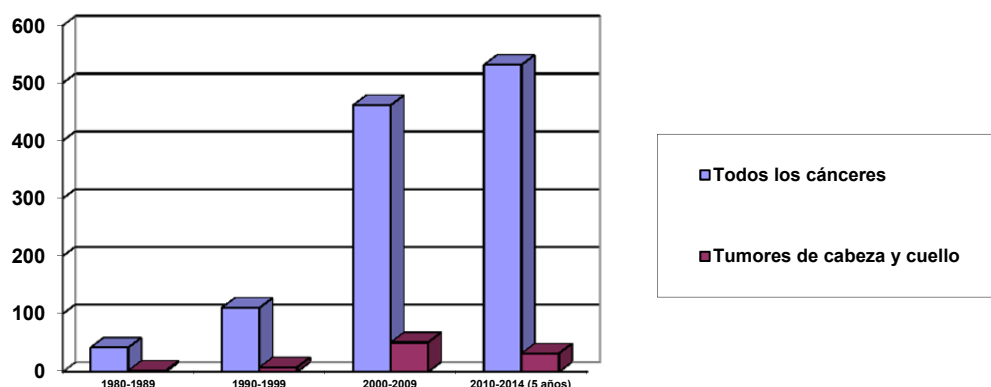


Fig. 4. Número de publicaciones sobre ácidos nucleicos libres circulantes en plasma y cáncer en las últimas décadas. Fuente: PubMed. Palabras clave: “plasma AND (circulating OR cell-free) AND (DNA OR RNA) AND cancer”. Para la búsqueda de tumores de cabeza y cuello, se sustituyó “cancer” por “head and neck cancer”. La búsqueda con “larynx cancer” o “laryngeal cancer” resultó negativa en todos los intervalos temporales.

El estudio de los CNA se ha aplicado también al estudio de otros procesos no tumorales, tales como diagnóstico prenatal, diabetes, ictus, traumatismos, enfermedades reumáticas o infarto de miocardio (45-47). Incluso actividades como el ejercicio físico intenso realizado en actividades atléticas, levantamiento de peso o pruebas de esfuerzo han demostrado un incremento de cfADN en personas sanas (48-50).

El término CNA se refiere a distintos tipos de ácidos nucleicos libres: ADN genómico (ADNg), ADN mitocondrial (ADNmit), ADN y ARN virales, ARN mensajero (ARNm), y microARN (ARNmi) que ha sido aislado recientemente en plasma (39, 46, 51-54). La conformación del ADN en el suero ha sido descrita como monocatenario por algunos autores (55) y como doble hélice por otros (56, 57)

El mecanismo preciso por el que los ácidos nucleicos son liberados al torrente circulatorio permanece incierto. Existen varias posibles fuentes de ácidos nucleicos en la sangre: lisis de células sanguíneas, necrosis tisular, ADN de la superficie leucocitaria, lisis de patógenos como bacterias o virus, apoptosis, liberación espontánea de ADN de nueva síntesis o liberación espontánea de complejos lipoprotéicos de ADN/ARN desde células sanas.

En sujetos sanos se cree que los ácidos nucleicos entran en la circulación via apoptosis de linfocitos y otras células nucleadas (58).

Para una parte de los investigadores, la principal fuente de ácidos nucleicos circulantes es la necrosis (59, 60). Sin embargo, se ha observado que después de un tratamiento con radioterapia, que teóricamente induce muerte celular, los niveles de cfADN sorprendentemente disminuyen en el 90% de los pacientes. Se ha sugerido que esta disminución de niveles se correspondería con la detención de la proliferación celular (35).

Otros autores han propuesto la apoptosis, a la vista del tamaño de los fragmentos detectados en el plasma (61). Así, la aparición de fragmentos mutados de ADN en el torrente circulatorio podría tener su origen en células apoptóticas o necróticas que han sido fagocitadas por macrófagos, que liberarían ADN parcialmente digerido (62). Pero esta teoría tampoco está libre de controversia, ya que se han reportando evidencias experimentales en contra (63).

También se ha postulado que el cfADN provendría principalmente de células vivas, cuando el tumor está proliferando, más que de células apoptóticas o necróticas. Algunos estudios han descrito la liberación celular activa de cfADN, y específicamente por linfocitos (64-66). Así, se ha comprobado que los linfocitos activados liberan ADN *in vitro* (56).

Otra posibilidad incluye que los ácidos nucleicos libres podrían ser liberados por células tumorales circulantes en el torrente sanguíneo, aunque existe una discordancia importante entre la cantidad de ácidos nucleicos libres y la escasa presencia de células tumorales en el torrente circulatorio (67, 68). Estas células circulantes no serían obligatoriamente metastáticas. Podrían haber adquirido la habilidad de entrar en el torrente circulatorio, pero no la capacidad de extravasarse y colonizar otros órganos (62) (Fig. 5).

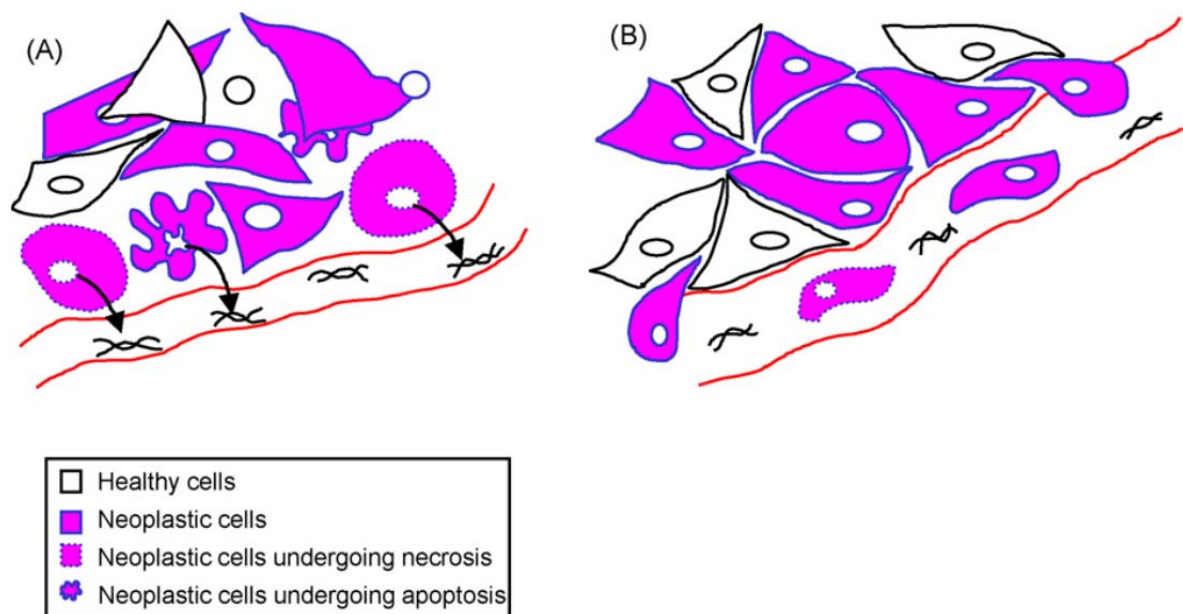


Fig. 5. Dos modelos de liberación de ADN en la sangre: (A) Las células pueden sufrir apoptosis y/o necrosis en los tejidos tumorales *in situ*, y liberar su ADN en el torrente circulatorio. (B) Las células se desprenden y extravasan al torrente circulatorio donde experimentan lisis y liberan su contenido de ADN. En ambos modelos es posible que los macrófagos jueguen un papel intermediario en la liberación de ADN a la sangre (tomado de referencia bibliográfica número 62, Gormally *et al.*, 2007).

No se debe excluir la hipótesis de que los CNA provengan de células sanas que rodean al tumor. Jahr *et al.* (2001) demostraron que cuando los niveles de cfADN son altos, el porcentaje de ADN tumoral es pequeño, y cuando los niveles de cfADN son bajos el porcentaje de ADN tumoral es alto, sugiriendo que la mayor parte del cfADN procedería no de células cancerosas, sino de células peritumorales sanas en proceso de necrosis (61). Un aspecto importante que ya se ha mencionado, y que permanece incierto, es la relación entre las

células tumorales circulantes libres en el torrente sanguíneo y los ácidos nucleicos de origen tumoral en el plasma. Se ha sugerido que el ADN y ARN procedente de estas células tendría un acceso más fácil a la sangre que los ácidos nucleicos procedentes de las células tumorales primarias. Por otro lado, la capacidad de liberación de estas células circulantes potencialmente metastásicas podría ser mayor (43). Sin embargo, en modelos animales se pudo comprobar que la detección de cfADN es anterior y más frecuente que la de células tumorales circulantes (69).

Otra cuestión, pendiente de dilucidar, es el significado del cfADN como respuesta del huesped al tumor, ya que se han encontrado grandes cantidades de ADN no tumoral liberadas durante la progresión del tumor, especialmente en estadios incipientes, sugiriendo una interacción entre el tumor y las células no tumorales. Además se ha descrito que los niveles de ADN no mutado suben muy precozmente, pero no se relacionan con el estadio tumoral o las metástasis (69, 70).

Teóricamente los CNA serían degradados rápidamente por nucleasas presentes en el torrente circulatorio. Se ha sugerido que la presencia de ADNasas I y II explicaría los mínimos niveles de ADN encontrados en sujetos sanos (58), ya que se ha comprobado escasa actividad de estas enzimas en pacientes con enfermedad neoplásica. Además, se ha encontrado inhibidores de ADNasa tanto en tumores (71), como en otras células tales como los trombocitos (72). Asimismo se ha demostrado que los cfADN mutados se degradan más rápidamente que los no mutados (73, 74). Sin embargo, esta degradación podría ser limitada, ya que el cfADN parece estar protegido, al menos en parte, por complejos o partículas con características especialmente protectoras frente a la actividad enzimática (29, 71, 75, 76).

En cualquier caso, los oncogenes contenidos en el ADN podrían comportarse como oncovirus y representar una vía de metastatización. De este modo, los tumores tendrían propensión a metastatizar en tejidos específicos que contendrían proteínas de unión o receptores para el ADN (77). Se ha propuesto el término de “genometástasis” para describir el fenómeno por el que se produce una transferencia horizontal entre células tumorales y sanas, que da lugar a la transformación oncogénica de éstas (78, 79) (Fig. 6).

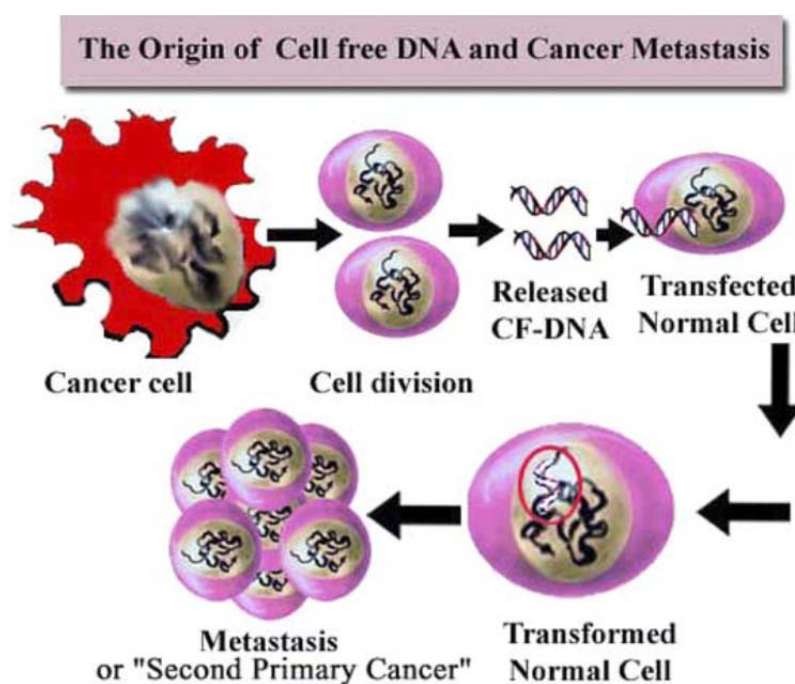


Fig. 6. Origen del ADN libre circulante y las metastasis en el cáncer. La división de las células cancerosas produciría una liberación de cfADN en los fluidos corporales, con capacidad de transferirse a las células adyacentes o remotas. Estas células transformadas mantendrían la capacidad de proliferación, dando lugar a metástasis o aparición de un segundo cáncer primario (tomado de referencia bibliográfica número 77, Chen *et al.*, 2005).

1.2.2 Valor clínico del ADN libre circulante

Son muchos los tipos de cáncer que han sido objeto de estudio sobre CNA, y los resultados, valorados en conjunto, sugieren que la presencia en sangre de ácidos nucleicos circulantes libres es un hecho común a todos ellos. La mayor parte de estos trabajos se ha centrado en el estudio del ADN, habiéndose descrito la presencia de cfADN tumoral, entre otros, en pacientes con cáncer de mama, cuello uterino, colon, esófago, estómago, cabeza y cuello, hígado, riñón, páncreas, piel, nasofaringe, ovario, próstata, pulmón, tiroides y hematológicos (39).

Se ha buscado un valor clínico del ADN plasmático desde varias perspectivas: detección de ADN tumoral (presencia/ausencia), cuantificación de ADN tumoral y/o cuantificación de ADN total (tumoral y no tumoral) en plasma. Posiblemente, la detección de ADN tumoral en plasma ha sido la opción más explorada, siendo objeto de decenas de estudios en muy diversos cánceres (ver revisión de González-Masiá *et al.*, 2013) (29).

Sin embargo, los estudios que buscan una posible correlación entre la detección de las distintas alteraciones genéticas en el plasma y distintos parámetros clínicos, o los que abordan el valor de estas determinaciones para el diagnóstico y/o el seguimiento de los pacientes cancerosos, ofrecen resultados muy variados y a veces contradictorios.

En los últimos años se ha reportado, entre otros, la monitorización clínica del cáncer de mama y de cabeza y cuello, basada en el análisis del cfADN tumoral (80, 81). Esto podría significar el inicio de una fase de desarrollo de pruebas estándar de aplicación en la clínica humana.

Los niveles en plasma de cfADN no son constantes, sino que se han detectado fluctuaciones, y esto se ha comprobado tanto en pacientes como en animales de experimentación, cuantificando el cfDNA en diferentes momentos de la enfermedad (36, 69, 70). En muchos casos la detección de cfADN tumoral se ha dado en pacientes con enfermedad metastásica avanzada, aunque ocasionalmente se ha detectado previamente al diagnóstico clínico (82). Diversos estudios, empleando un modelo animal de cáncer, han coincidido con estas observaciones, mostrando que a lo largo de la progresión tumoral, la detección en plasma de las secuencias de *KRAS* mutado, propias de las células tumorales inyectadas en los animales, era anterior y más frecuente que la de células tumorales circulantes (68). De la misma forma, se ha demostrado que la diseminación hematógena tras la exéresis quirúrgica del tumor primario parecía estar más relacionada con la liberación de ADN extracelular que con la de células tumorales (83).

Muchos autores han analizado el valor de la cuantificación del ADN libre en plasma como marcador tumoral (39, 84) y parte de ellos han coincidido en el valor clínico de esta determinación, en combinación con otras herramientas diagnósticas para el diagnóstico temprano de distintos tipos de tumores como el pulmonar (84), mamario (85) o el carcinoma hepatocelular (86).

Varios trabajos describen la correlación entre los niveles de ADN y factores pronósticos conocidos (80). En cáncer de pulmón, se ha encontrado una estrecha relación entre niveles plasmáticos de ADN, lactato deshidrogenasa (LDH) sérica y concentraciones de enolasa neuroespecífica (NSE), con similar relación entre cada marcador y la supervivencia de los pacientes (87). Igualmente los niveles de ADN se correlacionaron con el estadio clínico, metástasis linfáticas y tamaño tumoral en el cáncer de mama (88). Asimismo, algunos estudios han mostrado que la cuantificación de ADN libre en plasma, mediante espectrofotometría con técnica de retención de la muestra (NanoDrop), puede ser

una herramienta mínimamente invasiva útil para el seguimiento y la detección de metástasis en pacientes con cáncer colorrectal (89).

Pero los estudios basados en la cuantificación de ADN tampoco están exentos de controversia. Por ejemplo, un estudio en el que se cuantificó el ADN plasmático en sujetos sanos y pacientes con cáncer de pulmón mediante colorimetría, mostró que los niveles de ADN permitían diferenciar a los pacientes cancerosos, incluso desde estadio T1 (84). Sin embargo, empleando una técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) para la cuantificación de la secuencia β -actina, otros autores no encontraron diferencia alguna entre sanos y enfermos de cáncer de pulmón (90).

Estas contradicciones pueden ser debidas en parte a los diferentes métodos empleados y a la heterogeneidad de la población analizada. Como se ha descrito previamente, Jahr *et al.* (2001) mostraron que situaciones clínicas similares están asociadas con diferentes niveles de ADN circulante en plasma, tanto tumoral como no tumoral, y postularon que aunque el cáncer generalmente cursa con un aumento de los niveles plasmáticos de ADN extracelular, la cantidad y composición de este varía entre pacientes. Usando PCR encontraron que la proporción de ADN tumoral varía entre 10% y 90% del total de cfADN, con más altas proporciones en las muestras con menores niveles de ADN total (61). Otros autores, en estudios previos, encontraron tasas menores de ADN tumoral (0,2 % - 10%) (91). De hecho, los niveles de ADN plasmático pueden verse afectados por muchos factores, que será necesario definir y tener en cuenta para lograr establecer el valor clínico de la cuantificación de cfADN en plasma.

1.2.3 Valor clínico del ARN libre circulante

El hallazgo de cfADN estimuló a los investigadores en la búsqueda de otros ácidos nucleicos circulantes. La ventaja teórica del análisis del ARN

plasmático sobre la detección de ADN, es que el primero podría aportar información sobre los patrones de expresión génica del tumor (92).

El estudio del cfARN implica un abordaje diferente al del cfADN, ya que la detección ADN tumoral implica la necesidad de una identificación previa de alteraciones de ADN en el tumor. En cambio el análisis de ARN tumoral puede basarse en la detección de ARN sobreexpresados en cada tipo de tumor. Aunque la investigación del cfARN ha sido más tardía, probablemente debido a la sofisticación técnica que precisa, y a la conocida inestabilidad de la molécula, los resultados obtenidos en su detección han sido sorprendentes, ya que se ha podido cuantificar y amplificar, a pesar de la alta concentración de ARNasas que existe en el suero de pacientes cancerosos.

La existencia de cfARN en sangre fue publicada por primera vez en la década de 1980, cuando Wieczorek *et al.* encontraron complejos lipoproteicos en el suero de pacientes con cáncer, así como en líneas celulares malignas (93). Sin embargo, el valor potencial de la detección de cfARN en plasma no atrajo la atención de los investigadores hasta 1999, cuando dos estudios paralelos informaron de la detección de ARNm de tirosinasa en pacientes con melanoma metastásico (94), y ARNm asociado al virus de Epstein-Barr en pacientes con carcinoma nasofaríngeo (95).

Muchos estudios han informado de la presencia de ARNm específico en el plasma de pacientes con distintos tipos de cáncer, como colon (96, 97), mama (43, 77), próstata (98), pulmón (99) o tiroides (100). La mayoría de estas moléculas tienen un tamaño de alrededor de 100 pb o menor, llegando incluso a estar constituidas por simples nucleótidos (39). El cfARN no solo es amplificable en muestras de pacientes con enfermedad avanzada, sino que está presente en pacientes portadores de tumores pequeños, bien diferenciados, sin afectación de ganglios linfáticos ni metástasis a distancia (101).

El ARN extracelular circula posiblemente en forma de complejos, unido a lípidos, proteínas, lipoproteínas o fosfolípidos, unido a ADN en nucleosomas o protegido en cuerpos apoptóticos u otras estructuras vesiculares (102). Ya Wieczorek *et al.* (1985) sugirieron que estos complejos lipoprotéicos parecían ser de origen secretorio en las células malignas, más que un producto de degradación (93). Años más tarde, Ng *et al.* (2002) reportaron que la mayoría de tipos de cfARN estaba asociado a partículas, conclusión a la que llegaron mediante filtración de muestras de plasma de sujetos sanos y pacientes con cáncer a través de materiales con poros de distinto tamaño. Encontraron mayores cantidades de cfARN asociado a partículas en pacientes con cáncer que en sanos (103).

La utilidad clínica del ARNm total en plasma ha sido relativamente poco explorada, en comparación con el gran número de trabajos centrados en la cuantificación de ADN total. De hecho, existen pocos trabajos que analicen la cantidad total de ARN (104), o el transcrito de genes constitutivos, tales como la GAPDH. Incluso en algunos casos, la cuantificación de estos últimos sirve sólo como control interno o para normalizar los niveles de otros ARN, y no son analizados como biomarcadores *per se* (105).

Aunque el cfARN no es específico en pacientes con cáncer, y se puede encontrar en voluntarios sanos o ante un traumatismo (29), se ha postulado que el cfARN es más sensible como biomarcador que el cfADN tumoral (106). Aunque la heterogeneidad de los resultados y la limitada potencia de los estudios realizados no ha permitido llegar a conclusiones definitivas, algunos trabajos han demostrado el valor clínico del cfARN. Por ejemplo, Silva *et al.* (2001) encontraron que en el cáncer de mama, el análisis en plasma de un ARNm epitelial específico (citoqueratina 19) en combinación con el de mamaglobina, facilita la detección en mayor número de casos positivos que lo hace el análisis de cfADN, relacionando su presencia con un peor pronóstico (43).

1.2.4 Ácidos nucleicos circulantes en plasma y cáncer de laringe

En lo que se refiere al cáncer laríngeo, son pocos los estudios que han tratado la utilidad clínica de la detección y análisis de CNA en plasma, y además, en la mayor parte de ellos se agrupan con otros tumores, y son incluidos a menudo en el nombre genérico de “cáncer de cabeza y cuello”.

En el año 2000, Coulet *et al.* ofrecieron resultados poco esperanzadores, concluyendo que “en el caso del cáncer de cabeza y cuello, la utilidad clínica de una prueba basada en el ADN plasmático permanece incierta” (107). Sin embargo, este estudio puede ser cuestionado, como ya se ha hecho, en lo que respecta a los métodos de laboratorio empleados y a la elección de los marcadores para estos tumores (un microsatélite y mutaciones en p53) (108).

Posteriormente, Nawroz-Danish *et al.* (2004) estudiaron un grupo de 152 pacientes de cáncer de cabeza y cuello, en cuyos sueros intentaron detectar inestabilidad de microsatélites, empleando un panel de 10 marcadores. Encontraron alteraciones de microsatélites en el ADN sérico en el 45% de los pacientes, idénticas al ADN tumoral correspondiente, concluyendo que la detección de ADN tumoral en suero mediante análisis de microsatélites puede ayudar a identificar pacientes con riesgo de metástasis (109). Sin embargo, no se pudo asociar estadísticamente la detección de ADN tumoral en suero con parámetros anatomoclínicos como estadio tumoral, recidiva, intervalo libre de enfermedad o supervivencia (109).

En este sentido, también otros autores analizaron un panel de 8 microsatélites en un grupo de 91 pacientes de cáncer de cabeza y cuello y encontraron que la presencia de ADN tumoral en plasma podría servir como una herramienta de diagnóstico precoz, pero no parecía tener valor pronóstico (110).

En un estudio reciente, los autores propusieron el uso de saliva y plasma para detectar tumores de cabeza y cuello mediante la detección de ADN tumoral libre. En cada paciente de un total de 93 (sólo 10 de laringe y 3 de hipofaringe), analizaron el tumor, buscando la presencia de papilomavirus humano o mutaciones somáticas, y después buscaron la misma alteración en plasma y/o saliva. En saliva, detectaron ADN tumoral en el 100% de pacientes con cánceres de cavidad oral y en el 47 - 70% de pacientes con tumores en otros lugares de cabeza y cuello. En plasma, el cfADN tumoral se detectó en el 80% de los primeros, y en un 86 - 100% de los segundos. Como se ha mencionado, estos resultados les sirvieron para proponer el ADN tumoral libre en saliva y plasma como biomarcador en los cánceres de cabeza y cuello (81).

Li *et al.* (2005) estudiaron la sobreexpresión de ARNm en tejidos tumorales y plasma de 34 pacientes con carcinoma escamoso de laringe, encontrando niveles más altos tanto en las muestras de tumor como en el plasma (105).

1.3 Cáncer y actividad telomerasa

1.3.1 Generalidades

Los telómeros son estructuras especializadas localizadas en los extremos de los cromosomas, ricas en guanina, que juegan un papel crítico en la estabilidad, replicación y función de los cromosomas, impidiendo la recombinación de estos o la fusión en los extremos. Aunque la secuencias varían entre especies, los telómeros son muy similares en los eucariotas. En los humanos y otros vertebrados están formados por varias kilobases de la repetición de la secuencia -TTAGGG, las cuales están repetidas entre 150 y 2000 veces. Análisis cromosómicos han mostrado que los telómeros pierden más de 200 kilobases de ADN por cada división celular *in vitro* e *in vivo*. El acortamiento cromosómico se relaciona en último extremo con el envejecimiento y la muerte celular (111-115).

Debido a su ubicación en el extremo final de los cromosomas (Fig. 7), existen limitaciones para realizar la copia de los telómeros durante la división celular. La enzima ADN polimerasa puede extender una cadena de ADN que se encuentra en fase de crecimiento, pero es incapaz de replicar los extremos cromosómicos ya que no puede incorporar el primer nucleótido de la nueva cadena de síntesis (116) El mantenimiento de los telómeros se realiza gracias a la actividad de una enzima compuesta por un complejo ribonucleoprotéico llamado telomerasa, descrita en 1985 por Greider y Blackburn (117) que sintetiza, mediante una actividad reverso-transcriptasa, hexámeros -TTAGGG de ADN en el extremo de los cromosomas a partir de un molde de ARN (118).

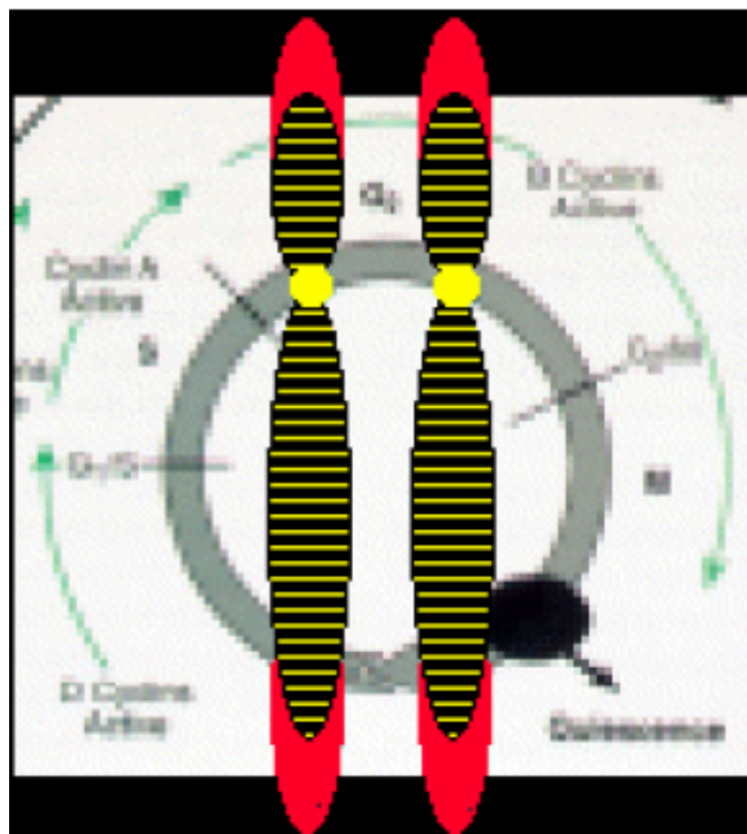


Fig. 7. Localización de los telómeros en los extremos de los cromosomas (tomado de referencia bibliográfica número 116, Ripoll, 2007).

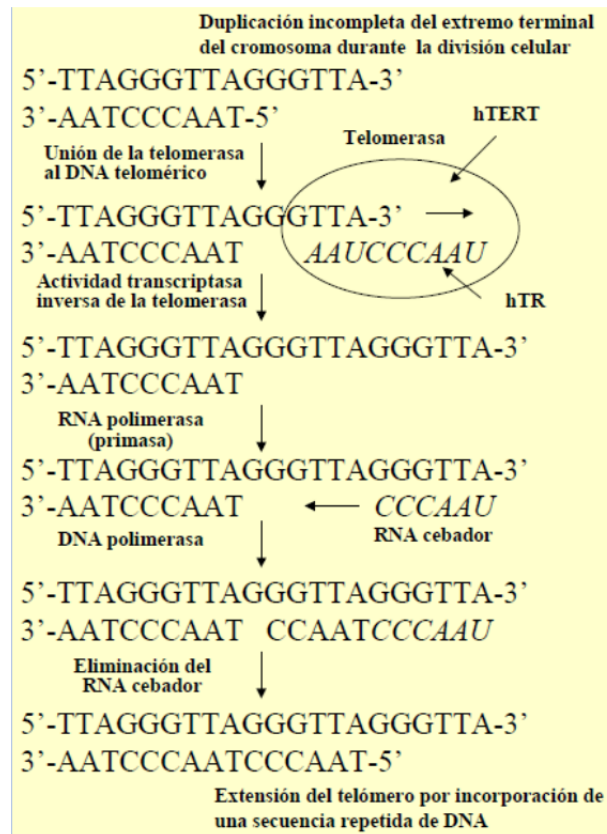


Fig. 8. Mecanismo de acción de la telomerasa (tomado de referencia bibliográfica número 116, Ripoll, 2007).

Respecto a su estructura, la telomerasa humana está constituida por 3 subunidades mayores:

1. El componente hTR (*human telomerase RNA* en la literatura anglosajona), contiene una región de 11 nucleótidos y aporta la plantilla de ARN para la síntesis de las secuencias repetidas de ADN telomérico (119).
2. El segundo componente más importante de la actividad enzimática es la transcriptasa inversa humana hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*). La hTERT es una gran proteína de 103–134 kDa que permite la síntesis de ADN a partir del ARN contenido en la subunidad hTR (120, 121).
3. El tercer componente está formado por las proteínas asociadas a la telomerasa: disquerina/NAP57, y proteínas humanas GAR1, NOP10 y NHP2 (122, 123).

La telomerasa, por tanto, transporta su propio molde de ARN, que es complementario de las secuencias repetidas del telómero, que forma parte del complejo enzimático, constituido por una parte por la región que transporta el molde del ARN, y por otra la subunidad protéica que dispone la actividad catalítica enzimática. El uso de este ARN como molde permite a la telomerasa generar múltiples copias de las secuencias repetidas teloméricas, gracias a su actividad enzimática, lo que permite mantener los telómeros en ausencia de un molde convencional de ADN que dirija esta síntesis (116) (Fig. 8).

Se ha propuesto que el acortamiento de los telómeros, en ausencia de telomerasa, puede funcionar como reloj mitótico celular, mediante el cual la célula cuenta sus divisiones celulares (124). Así, el telómero alcanza una longitud crítica y se induce la senescencia. La telomerasa, mediante el mantenimiento de la longitud del telómero, permite a las células escapar de esta fase y proliferar indefinidamente, impidiendo la muerte celular (125). Sin embargo la telomerasa por sí misma no es oncogénica, como se ha mostrado en un estudio, en el que las líneas celulares a las que se transfirió el gen hTERT no mostraron transformación maligna durante un largo periodo de tiempo (126, 127).

Hasta la fecha el ensayo principal para detectar la actividad telomerasa es el TRAP (*Telomere repeat amplification protocol*). Se trata de una prueba cualitativa o semicuantitativa, y no puede mostrar los niveles de actividad telomerasa de forma precisa, necesitando ribonucleoproteínas funcionales, incluyendo tanto actividad transcriptasa inversa como ARN no degradado. Además la presencia de inhibidores de telomerasa, inhibidores de polimerasa Taq, proteasas o ARNasas puede influenciar su detección y subsecuentemente disminuir su sensibilidad para un determinado nivel de expresión de hTERT (128). Por tanto, se ha sugerido que se requeriría un nivel umbral de proteína hTERT para activar la telomerasa (129), ya que habitualmente sólo se detecta un nivel considerable de actividad telomerasa en tumores que expresan 10.000 o más copias de hTERT ARNm por µg de ARN. Así, niveles bajos de hTERT

ARNm pueden no indicar actividad telomerasa, y por ello algunos autores han sugerido que la expresión de hTERT ARNm podría no correlacionarse con la actividad telomerasa (130). Además se ha detectado expresión de hTERT ARNm en linfocitos, independientemente de la actividad telomerasa (131). Otro problema añadido es la existencia de variantes de ensamblaje que podría ser problemática para la detección de hTERT ARNm (132).

Sin embargo, diferentes autores han encontrado un buen nivel de correlación entre la actividad telomerasa y la expresión de hTERT ARNm en líneas celulares humanas y células hematopoyéticas (133, 134). Similares observaciones se han encontrado en diversos tumores como carcinoma gástrico (135), hepático (136), renal (137), endometrio y ovario (138, 139), y mama (130). Además se ha encontrado una tendencia a la asociación de hTERT ARNm y la fracción tumoral en fase S (que es un marcador de proliferación celular y un indicador de pronóstico negativo) (130). Algunos autores han encontrado que una alta expresión de hTR se correlaciona significativamente con un pobre pronóstico en pacientes con neuroblastoma (140).

La detección de telomerasa por técnicas enzimáticas es compleja y larga en el tiempo y, como se ha apuntado previamente, puede complicarse por la presencia de inhibidores enzimáticos, proteasas o ARNasas, lo que restringe su utilidad en un escenario clínico (141). La actividad telomerasa puede valorarse mediante diversas técnicas, entre las que hemos de destacar la PCR cuantitativa en tiempo real (142), que detecta y cuantifica un fragmento de hTERT ARNm de 144 bases, haciendo este ensayo menos sensible a la actividad ARNasas e insensible a las proteasas y enzimas inhibidores (130, 143).

1.3.2 Actividad telomerasa en tumores

La actividad telomerasa en tejidos tumorales fue demostrada por primera vez en el carcinoma de ovario (144) y posteriormente se ha comprobado que está presente en el 70 - 100% de los tejidos malignos y en muchas líneas celulares inmortales, de modo que es prácticamente indetectable en los tejidos no tumorales, exceptuando ciertas células, como células madre, linfocitos, células germinales, mucosa oral o endometrio en la fase proliferativa del ciclo menstrual (113, 130, 145-151). En la mayoría de las células cancerosas ocurre un acortamiento considerable de los telómeros antes de la reexpresión de la telomerasa (152). La longitud de los telómeros en esta situación patológica, en la que gran número de células se han convertido en inmortales, parece depender de un equilibrio entre la pérdida de repeticiones teloméricas en cada ciclo de replicación del ADN y la síntesis de repeticiones teloméricas mediadas por la actividad telomerasa (153). Las dos subunidades principales de la telomerasa humana: el gen ARN (hTR) y su componente catalítico (hTERT) han sido detectados específicamente en líneas celulares cancerosas, y en tejidos neoplásicos extraídos en la práctica clínica (139, 154-158). El gen hTR y las proteínas asociadas a la telomerasa se expresan ubicuamente tanto en tejidos sanos como cancerosos (156), mientras que hTR y hTERT son indetectables en tejidos o suero de pacientes con enfermedades benignas y en suero de sujetos sanos (101). Además, las subunidades hTR y hTERT son expresadas independientemente *in vivo*, aunque se conoce poco sobre el mecanismo de su ensamblaje (155). Esto podría explicar la discordancia de los resultados de hTR y hTERT en el suero de algunos pacientes (101), que ha sido observada por diferentes autores (154-156).

Se ha encontrado una relación estrecha entre la expresión de hTERT ARNm y actividad de telomerasa, sugiriendo que la cuantificación de hTERT ARNm puede ser usada como alternativa a la medida de actividad de esta enzima

(138, 159-163). Igualmente se ha sugerido que la actividad telomerasa podría ser un indicador para determinar el grado de malignidad en tumores a veces indistinguibles mediante análisis histopatológico, como ocurre en algunos tumores cerebrales, adenocarcinoma papilar de tiroides, tumores endocrinos pancreáticos, carcinoma urotelial o neoplasia cervical intraepitelial (164).

1.3.3 Actividad telomerasa en el cáncer de laringe

Como se ha descrito, aunque muchos investigadores han encontrado la telomerasa como un marcador útil para el diagnóstico y pronóstico en varios tipos de cáncer, pocos estudios se han dirigido a su papel en el cáncer de cabeza y cuello, y especialmente en laringe y/o hipofaringe. Sólo un número limitado de trabajos hasta la fecha han sido publicados usando un protocolo TRAP para la medida de la actividad telomerasa en esta localización (125, 149, 165-168).

Se considera que la telomerasa está implicada en la acumulación de anomalías genéticas adicionales, culminando en un tumor invasivo (169, 170). La subunidad hTERT ARNm puede ser detectada ocasionalmente en epitelio laríngeo normal, pero su frecuencia y su cantidad relativa es significativamente más alta en el carcinoma de células escamosas. La detección de hTERT ARNm en tejidos laríngeos normales y con mucosa reactiva se ha atribuido a la presencia de células troncales, que ya se conoce que están presentes en el epitelio escamoso, pero las cantidades relativas de hTERT ARNm, detectadas mediante RT-PCR, se incrementan progresivamente con el grado de anomalías epiteliales, de modo que son más altas en la hiperplasia atípica que en la hiperplasia reactiva (171, 172). Por tanto, se ha establecido la hipótesis de que la sobreexpresión del gen hTERT representa un acontecimiento temprano en el proceso de la carcinogénesis laríngea, aunque no todos los estudios sustentan esta teoría, como se muestra en la breve revisión que se expone a continuación.

Hohaus *et al.* (1996) estudiaron 35 pacientes con cáncer de laringe, y mediante técnica TRAP se detectó actividad telomerasa en el 89% de las muestras de tumor. Se encontró una correlación positiva entre estadios avanzados de la enfermedad y actividad telomerasa, siendo ésta negativa o débilmente positiva en los tumores con estadio I, y apareciendo máxima actividad en los estadios IV (166).

Curran *et al.* (1998) estudiando tumores de cavidad oral, encontraron que la actividad telomerasa se incrementaba con el estadio tumoral, y que los cánceres T4 expresaban niveles más altos que las categorías T más bajas (173). En otro trabajo Curran *et al.* (2000) investigaron mediante TRAP la actividad telomerasa en las muestras de tumor y tejidos adyacentes en un grupo de 20 pacientes con cáncer de laringe recurrente, tratados previamente con radioterapia y/o radioquimioterapia, y que requirieron cirugía de rescate con laringectomía. Se detectó actividad telomerasa en el 85% de tejidos tumorales y en el 20% de tejidos con aspecto macroscópico sano (125).

Luzar *et al.* (2001) detectaron niveles mayores de hTERT ARNm en el carcinoma escamoso de laringe de grado histopatológico más alto y menos diferenciado. De hecho, los carcinomas sin detección de actividad hTERT producían un menor grado de enfermedad. Sin embargo, no se encontró relación entre el nivel de expresión de hTERT ARNm y el tamaño tumoral o la afectación regional de los ganglios linfáticos (171).

Li *et al.* (2005) sugirieron que la sobreexpresión de hTERT ARNm juega un papel crucial en el desarrollo del carcinoma escamoso de laringe. Los resultados cuantitativos mostraron que el nivel de hTERT ARNm en las muestras de tumor estaba elevado alrededor de 17,9 veces respecto a los tejidos normales adyacentes. Igualmente encontraron niveles elevados de esta molécula en el plasma de los pacientes con cáncer. Sin embargo no se encontró correlación significativa entre la sobreexpresión de hTERT ARNm y parámetros patológicos

como localización tumoral o grado T, de modo que los niveles de este gen no se correlacionaban con el volumen o grado de infiltración tumoral. Tampoco se encontró relación con el grado N (105).

De todo lo expuesto, se puede deducir que el análisis de los ácidos nucleicos circulantes en el plasma, en el contexto de lo que actualmente se denomina “biopsia líquida”, ha llevado a resultados muy alentadores en la búsqueda de herramientas clínicas para el manejo de la enfermedad cancerosa, por lo que es necesario seguir profundizando. Por otra parte, la naturaleza ubicua de la expresión telomerasa en un fenotipo maligno, y la sensibilidad de las técnicas basadas en la PCR, sugieren que la detección y cuantificación del ARNm hTERT puede ser una estrategia atractiva en la búsqueda de esas herramientas con valor clínico en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de una variedad de tumores, siendo los de laringe e hipofaringe algunos de los menos estudiados hasta ahora.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Evaluar la utilidad clínica de la detección y cuantificación de ARN (hTERT ARNm y GAPDH ARNm) en el plasma de pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe.

2.2 Objetivos específicos

1.- Evaluar la utilidad de la cuantificación de ARN (hTERT ARNm y GAPDH ARNm) en plasma como herramienta diagnóstica del carcinoma de laringe e hipofaringe.

2.- Analizar la correlación entre los niveles de ARN plasmático, tumoral (hTERT ARNm) y no tumoral (GAPDH ARNm), y los distintos parámetros anatomoclínicos: estadio tumoral y presencia de metástasis linfáticas regionales cervicales y a distancia.

3.- Valorar la evolución de los niveles de ARN plasmático, tumoral (hTERT ARNm) y no tumoral (GAPDH ARNm), en el perioperatorio de la exéresis quirúrgica tumoral.

4.- Analizar la correlación entre los niveles de ARN plasmático, tumoral (hTERT ARNm) y no tumoral (GAPDH ARNm), y la evolución clínica y la supervivencia tras el tratamiento quirúrgico.

2.3 Objetivo secundario

Valorar la evolución de los niveles de ADN total en plasma, en el perioperatorio de la exéresis quirúrgica tumoral, y analizar su correlación con la evolución clínica y la supervivencia tras el tratamiento quirúrgico

2.4 Hipótesis

2.4.1 Hipótesis conceptual

El desarrollo y progresión del carcinoma de laringe e hipofaringe se asocia a un aumento de los niveles de ARN libre en plasma, tanto tumoral como no tumoral, por lo que la determinación de estos niveles es de utilidad clínica en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento post-terapéutico de estos pacientes.

2.4.2 Hipótesis operativas

En pacientes con carcinoma larínge e hipofaringe se detecta más hTERT ARNm circulante en plasma que en sujetos sanos. Los niveles de este ARN permiten predecir recidiva y metastatización.

En pacientes con carcinoma larínge e hipofaringe se detecta más ARNm de GAPDH (del inglés, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) circulante en plasma que en sujetos sanos. Los niveles de este ARN permiten predecir recidiva y metastatización.

2.4.3 Hipótesis estadísticas

Hipótesis nula: no hay diferencias en los niveles de ARN plasmático, tumoral o no tumoral, entre pacientes con carcinoma laríngeo e hipofaríngeo y sujetos sanos, ni entre pacientes con distinto estadio tumoral.

Hipótesis alternativa: en los pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe pueden detectarse niveles de ARN plasmático significativamente mayores que en sujetos sanos. Los niveles de estos ácidos nucleicos disminuyen tras el tratamiento y se elevan de nuevo previamente al diagnóstico de recidivas y metástasis

III. MATERIALES Y MÉTODO

III. MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Sujetos de estudio

Se estudiaron dos grupos:

Grupo de estudio: lo formaron 49 pacientes con cáncer (47 de laringe y 2 de hipofaringe), diagnosticados según el protocolo clínico adoptado por el Servicio de Otorrinolaringología (ORL) del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA).

Criterios de inclusión:

- 1.-Pacientes con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma escamoso de laringe o hipofaringe.
- 2.-Pacientes tratados quirúrgicamente con intención curativa.
- 3.-Pacientes que cumpliendo los requisitos generales (mayor de edad, no incapacidad, etc.), firmaron el documento de consentimiento informado (Anexo I) para donación de muestras biológicas para el Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete y autorización para trabajar con sus muestras de tejidos y plasma en el laboratorio.

Criterios de exclusión:

- 1.-No cumplir alguno de los criterios de inclusión.
- 2.-Pacientes con problemas graves de coagulación que impidieran el normal procesamiento de la muestra plasmática.

El periodo de reclutamiento de los pacientes con cáncer se prolongó entre los días 8 de julio de 2008 y 27 de noviembre de 2013.

Grupo control: lo formaron 27 sujetos y se obtuvo a partir de los pacientes atendidos en la Consulta Externa de ORL del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete por otra patología distinta del cáncer, en los que se comprobó la ausencia de antecedentes de enfermedad oncológica, independientemente de su localización. Este grupo se reclutó de forma consecutiva entre el 20 de junio de 2014 y el 9 de enero de 2015.

Tanto pacientes como voluntarios sanos, recibieron adecuada información del objetivo de la toma de muestra y prestaron su consentimiento, tanto para el uso de las muestras de tumor por parte del Biobanco, como para el presente estudio (Anexo I).

3.2 Diseño del estudio

El presente estudio se abordó desde dos aspectos: un estudio transversal (caso-control), para establecer el valor diagnóstico de las determinaciones en plasma, y un estudio longitudinal de cohortes, para evaluar el valor pronóstico y predictivo de estas determinaciones.

3.3 Manejo de los pacientes con cáncer: diagnóstico, tratamiento y seguimiento.

Para realizar el diagnóstico y estadificación clínica (cTNM), en cada paciente se realizó una exploración de cabeza y cuello completa, incluyendo cavidad oral, faringoscopia, laringoscopia indirecta y/o rinofibrolaringoscopia. Se evaluó el aspecto, localización y extensión del tumor, y la movilidad de los tejidos laríngeos (especialmente del cartílago aritenoides y cuerda vocal). Además, se descartó la existencia de una segunda localización tumoral en la vía aerodigestiva superior. Por último, se realizó una palpación completa de todas las áreas ganglionares cervicales.

La confirmación histológica de neoplasia maligna se realizó, en la mayoría de los casos, mediante biopsia obtenida bajo anestesia local con fibroscopio con canal de trabajo (Fujinon, Fujifilm Corporation, Tokyo, Japón). Se realizó biopsia bajo anestesia general cuando i) las biopsias obtenidas bajo anestesia local no eran suficientes y/o definitivas para un diagnóstico, ii) la exploración bajo anestesia local no era suficiente para valorar adecuadamente la localización y extensión de la enfermedad neoplásica, y iii) cuando se sospechó una segunda localización tumoral en la vía aerodigestiva superior.

Como estudio de imagen para la estadificación de la enfermedad se realizó una tomografía axial computerizada (TAC) cervicotorácica (cortes axiales, sin y con contraste), para valorar la extensión local de la enfermedad tanto en superficie como en profundidad, volumen tumoral, la presencia de metástasis regionales cervicales o mediastínicas, y descartar la presencia de un segundo tumor en la esfera ORL o broncopulmonar. Cuando se consideró necesario se realizó una TAC cérvico-torácica-abdominal ó Resonancia Magnética Nuclear (RMN T1 y T2, y tras la inyección de gadolinio). Fueron considerados aspectos importantes para la estadificación tumoral el grado de afectación del espacio hiotiroepiglótico, del espacio paraglótico, la afectación cartilaginosa de la laringe o la invasión de tejidos cervicales.

Cuando se consideró necesario, se realizó una punción-aspiración con aguja fina (PAAF) de los ganglios linfáticos cervicales sospechosos de enfermedad metastática regional. Eventualmente esta técnica se realizó bajo control ecográfico. Tras completar la exploración clínica, estudios de imagen y análisis anatomopatológico, los casos clínicos fueron estadificados según la clasificación TNM de AJCC (American Joint Committee on Cancer, 2010, 7ª Ed.) (174) (Tablas I y II).

Tras el diagnóstico por parte del Servicio de ORL, cada caso fue presentado en el Comité de Tumores de Cabeza y Cuello del CHUA (en el que participan los Servicios de Otorrinolaringología, Cirugía Maxilofacial, Oncología Radioterápica, Oncología Médica, Radiodiagnóstico y Anatomía Patológica) y se propusieron las alternativas terapéuticas para cada paciente. En todos los pacientes incluidos en este estudio se había propuesto un tratamiento quirúrgico con intención curativa.

Tras la intervención y el análisis anatomopatológico de la pieza quirúrgica, en cada caso se realizó una clasificación patológica (pTNM), y fueron nuevamente presentados en el Comité de Tumores, donde se valoró la posible indicación de un tratamiento adyuvante con radioterapia y/o quimioterapia. Tras completar el tratamiento, cada paciente realizó revisiones periódicas en la consulta externa del Servicio de ORL del CHUA. La frecuencia habitual de estas revisiones está establecida cada 6 a 8 semanas durante el primer año, cada 8 a 12 semanas durante el segundo y tercer años, cada 6 meses el cuarto año, y anualmente a partir del quinto año del tratamiento.

CLASIFICACION T CANCER DE LARINGE E HIPOFARINGE	
Tx	No se puede evaluar el tumor primario.
T0	No hay evidencia de tumor primario.
Tis	Tumor <i>in situ</i> .
CÁNCER DE SUPRAGLOTIS	
T1	Invasión de un subsitio de la supraglotis, con movilidad normal de la cuerda vocal. Invasión de la mucosa de más de un subsitio de la supraglotis, glotis o fuera de la supraglotis (ej. mucosa de la base de la lengua, vallécula, pared medial del seno piriforme) sin fijación de la laringe.
T2	Tumor limitado a la laringe, con fijación de la cuerda vocal y/o invade una de las siguientes zonas: área postcricoidea, espacio preepiglótico, espacio paraglótico y/o cortical interna del cartílago tiroides.
T3	Enfermedad local moderadamente avanzada. El tumor presenta invasión a través del cartílago tiroides y/o invade a tejidos más allá de laringe (como tráquea, tejidos blandos del cuello, musculatura profunda extrínseca de la lengua, músculos prelaríngeos, glándula tiroides o esófago).
T4a	Enfermedad local muy avanzada. El tumor afecta a la fascia prevertebral, engloba la arteria carótida o invade estructuras mediastínicas.
T4b	

CÁNCER DE GLOTIS	
T1	Tumor limitado a la cuerda vocal (puede afectar la comisura anterior o posterior) con movilidad normal de la cuerda vocal. T1a: Afecta a una cuerda vocal T1b: Afecta a las 2 cuerdas vocales
T2	El tumor se extiende a la supraglotis y/o subglotis y/o existe limitación de la motilidad de la cuerda vocal.
T3	Tumor limitado a la laringe, con fijación de la motilidad de la cuerda vocal y/o afectación del espacio paraglótico, y/o cortical interna del cartílago tiroides.
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada. El tumor invade a través de la cortical externa del cartílago tiroides, y/o afecta a estructuras más allá de la laringe (ej. tráquea, tejidos blandos del cuello, incluyendo musculatura profunda extrínseca de la lengua, músculos prelaríngeos, glándula tiroides o esófago).
T4b	Enfermedad local muy avanzada. El tumor invade la fascia prevertebral, engloba la arteria carótida o invade estructuras mediastínicas.
CÁNCER DE SUBGLOTIS	
T1	Tumor limitado a la subglotis.
T2	El tumor se extiende a la(s) cuerda vocal (es) con movilidad normal o disminuida.
T3	Tumor limitado a la laringe con fijación de la cuerda vocal.
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada. El tumor invade a través de la cortical externa del cartílago tiroides, y/o afecta a estructuras más allá de la laringe (ej. tráquea, tejidos blandos del cuello, incluyendo musculatura profunda extrínseca de la lengua, músculos prelaríngeos, glándula tiroides o esófago).
T4b	Enfermedad local muy avanzada. El tumor invade la fascia prevertebral, engloba la arteria carótida o invade estructuras mediastínicas.
CLASIFICACION N CÁNCER DE LARINGE E HIPOFARINGE	
N0	Ausencia de metástasis cervicales.
N1	Metástasis en un único ganglio cervical homolateral ≤ 3 cm en su diámetro mayor.
N2a	Metástasis en un único ganglio cervical homolateral >3 cm y ≤ 6 cm en su diámetro mayor.
N2b	Metástasis en varios ganglios cervicales homolaterales, ninguno mayor de 6 cm en su diámetro mayor.
N2c	Metástasis en varios ganglios cervicales, de forma bilateral o contralateral, ninguno mayor de 6 cm.
N3	Metástasis en un ganglio linfático cervical > 6 cm en su diámetro mayor.
CLASIFICACION M CÁNCER DE LARINGE E HIPOFARINGE	
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia

Tabla I. Clasificación TNM del cáncer de laringe e hipofaringe, según AJCC.

ESTADIOS CÁNCER DE LARINGE E HIPOFARINGE	
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T3 N0 M0
	T1 N1 M0
	T2 N1 M0
	T3 N1 M0
IVA	T4a N0 M0
	T4a N1 M0
	T1 N2 M0
	T2 N2 M0
	T3 N2 M0
	T4a N2 M0
IVB	T4b Cualquier N M0
	Cualquier T N3 M0
IVC	Cualquier T Cualquier N M1

Tabla II. Clasificación del estadio tumoral del cáncer de laringe e hipofaringe, según AJCC.

3.4. Recogida y procesamiento de las muestras

3.4.1 Recogida de muestras sanguíneas y de tejidos

Se recogieron muestras de sangre periférica en el preoperatorio y en el postoperatorio, así como muestras de tumor y de tejidos faringolaríngeos adyacentes.

Durante la inducción anestésica previa a la intervención quirúrgica, se extrajo de cada paciente la primera muestra de sangre, mediante punción en la vena cubital. Concretamente se obtuvieron 10 ml de sangre venosa periférica que se depositaron en tubos con EDTA (Vacuette, Greiner Bio-one, GmbH, Austria). Dichas muestras se procesaron inmediatamente para la obtención de plasma, tal como se indica en los siguientes párrafos.

Inmediatamente tras la extirpación del tumor se extrajeron muestras representativas de éste. En el caso de laringectomía total, se accedió a la laringe cortando la lámina posterior del cartílago cricoides, en la línea media en su eje vertical para exponer completamente la mucosa laríngea, y se obtuvieron muestras de la parte más central del tumor. Aparte, se obtuvieron muestras de tejidos adyacentes, con aspecto macroscópico sano, separadas y distantes más de 2 cm del tumor. Se tuvo especial cuidado durante este procedimiento, mediante cambio de guantes por el cirujano y uso de diferentes hojas de bisturí, para evitar la contaminación accidental de las diferentes muestras obtenidas. La toma de muestras de tejidos se realizó en coordinación con el Biobanco y el Servicio de Anatomía Patológica del CHUA. Todas las muestras fueron registradas, asignándoles un número de entrada, anotando la fecha de recogida, nombre y apellidos del paciente y número de historia clínica. Una parte se colocaron en criomoldes de plástico embebidas en medio criosolidificable (Tissue-Tek[®]; Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holanda), y se congelaron con prontitud sumergiendo esos criomoldes en 2-metil-butano enfriado a -80°C. A continuación se archivaron en los ultracongeladores a -80°C hasta el momento de su análisis. El resto de la pieza quirúrgica tumoral se remitió al Servicio de Anatomía Patológica del CHUA, siguiendo los protocolos habituales, para el estudio anatomopatológico estándar y la correcta identificación y estadificación del tumor.

En los pacientes con cáncer se extrajo la segunda muestra de sangre venosa entre 28 y 233 días tras la intervención quirúrgica. En el grupo control se realizó una única extracción de 10 ml de sangre venosa en el momento de la consulta.



Fig. 9. Laboratorio de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA)

3.4.2 Procesamiento inicial de las muestras de sangre y aislamiento del plasma

Todas las muestras sanguíneas fueron procesadas en la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (fig. 9). En el plazo máximo de tres horas tras la extracción, se sometieron a dos centrifugaciones. La primera durante 10' a 1.800 x g. Tras ella se recogió el plasma, con cuidado de no arrastrar el sedimento, y se sometió a una segunda centrifugación durante 10' a 3.000 x g. El plasma obtenido entonces fue el utilizado para los posteriores análisis. Las muestras de plasma se alicuotaron y conservaron a una temperatura de -80°C hasta el momento de su análisis.

3.4.3 Extracción de ARN plasmático

La extracción del ARN de las muestras plasmáticas, se realizó con el *kit* denominado “Qiaamp UltraSens Virus” (Qiagen, Hilden, Germany), partiendo de un volumen de 1 ml y siguiendo las instrucciones del fabricante. Al finalizar el proceso, las muestras se sometieron a una digestión enzimática para eliminar el ADN que se pudiera haber extraído paralelamente. Para ello se utilizó el *kit* denominado “QuantiTect[®] Reverse Transcription” (Qiagen).

Para comprobar la ausencia de ADN en la muestras resultantes, se sometieron a una PCR convencional, empleando los cebadores para amplificación de una secuencia del gen GAPDH, que se describirán en siguientes apartados.

Al finalizar el proceso, el ARN resultante se cuantificó mediante espectrofotometría de retención de muestra NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher, Wilmington, EE.UU.), empleando 2 µl de cada muestra. Las muestras se conservaron a –20°C hasta su uso.

3.4.4 Extracción de ARN de tejidos

La extracción del ARN de las muestras de tumor y de tejidos adyacentes corrió a cargo del Biobanco del CHUA. En primer lugar se realizaron cortes de 30 µm con un criostato, y seguidamente se utilizó el *kit* “All Prep DNA/RNA Mini” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para prevenir la contaminación con ADN en el ARN retenido, se realizó un tratamiento con la enzima ADNasa I con el “DNase set” (Qiagen), según el protocolo recomendado. La ausencia de ADN se valoró mediante una PCR para detección de un fragmento de 249 pares de bases del gen de beta-globina humana.

El ARN obtenido se valoró en concentración y pureza en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 usando 2 µl. La integridad del ARN se estudió valorando la de los ARN ribosómicos 28S y 18S mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en búfer. Las muestras de ARN se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.4.5 Extracción y cuantificación de ADN plasmático

En un grupo de 38 muestras de plasma procedentes de 19 pacientes con cáncer, se realizó una cuantificación de ADN, mediante fluorimetría, sin extracción previa: se empleó el “Quant-iT™ dsDNA Assay Kit, High Sensitivity” (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.).

3.4.6 Detección de hTERT ARNm en tejidos

Con el fin de establecer si en los tumores de laringe e hipofaringe se podía detectar actividad telomerasa en mayor cantidad que en los tejidos adyacentes al tumor, y con aspecto macroscópico normal, se aplicó una técnica de RT-PCR para detectar el ARNm específico en un grupo de 18 muestras pareadas (tumor / tejidos adyacentes) y en 12 tejidos tumorales más (en total 30 tejidos tumorales, 18 tejidos adyacentes).

Esta técnica se compone de dos reacciones: la transcripción del ARNm en ADN complementario (ADNc) y la amplificación de éste. En el presente trabajo, ésta se realizó con una técnica de PCR en tiempo real, basada en el uso de sondas fluorescentes (sondas “Taqman”).

La tecnología Taqman se basa en que una sonda diseñada de esa forma no emite fluorescencia, puesto que la del extremo marcado con fluoresceína (*reporter*) es absorbida por el marcado con rodamina (*quencher*). Si hay replicación, la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa hace que la

sonda se convierta en nucleótidos libres, por lo que se elimina esa transferencia entre los dos marcajes y se emite fluorescencia.

La transcripción se realizó con el *kit* “Quantitect® Reverse Transcription” (Qiagen). Para la amplificación de un fragmento de 95 pb del ADNc de la subunidad hTERT de la telomerasa humana, se emplearon dos cebadores y una sonda Taqman específica, cuyas secuencias quedan detalladas en la Tabla III.

Para elaborar la mezcla de reacción, se empleó el *kit* denominado “LC DNA Master^{PLUS} Hyb Probes” (Roche Diagnostics GmbH), que contenía la ADN polimerasa, los desoxinucleótidos y el cloruro de magnesio necesarios para la reacción. En cada mezcla de reacción se añadió 1 µl de la enzima uracil ADN glicosilasa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) para reducir el riesgo de contaminaciones con amplificadores humanos previos. No obstante, en cada sesión de RT-PCR se incluyó un control negativo (con agua, en vez de ARN molde), para detectar ese tipo de contaminaciones, y un control positivo con ARN extraído de un tumor testado previamente y positivo a la detección de hTERT.

Las muestras de ARN junto con los cebadores, sonda y mezcla de reacción, se sometieron a 47 ciclos de temperaturas, según el patrón que aparece en la fig.10.

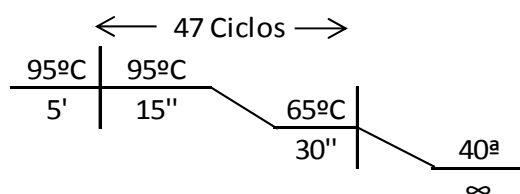


Fig. 10. Patrón de temperaturas empleado en la amplificación del ADNc de hTERT

Cada muestra se analizó por triplicado, y se anotó el resultado de cada réplica.

Las reacciones, así como la interpretación de resultados (detección y cuantificación de ARNm) se realizó con el sistema LightCycler (“LightCycler software”, versión 3.5; Roche, Vedback, Denmark) (Fig. 11). La lectura de fluorescencia se realizó a 530/ 640 nm (Fig. 12).

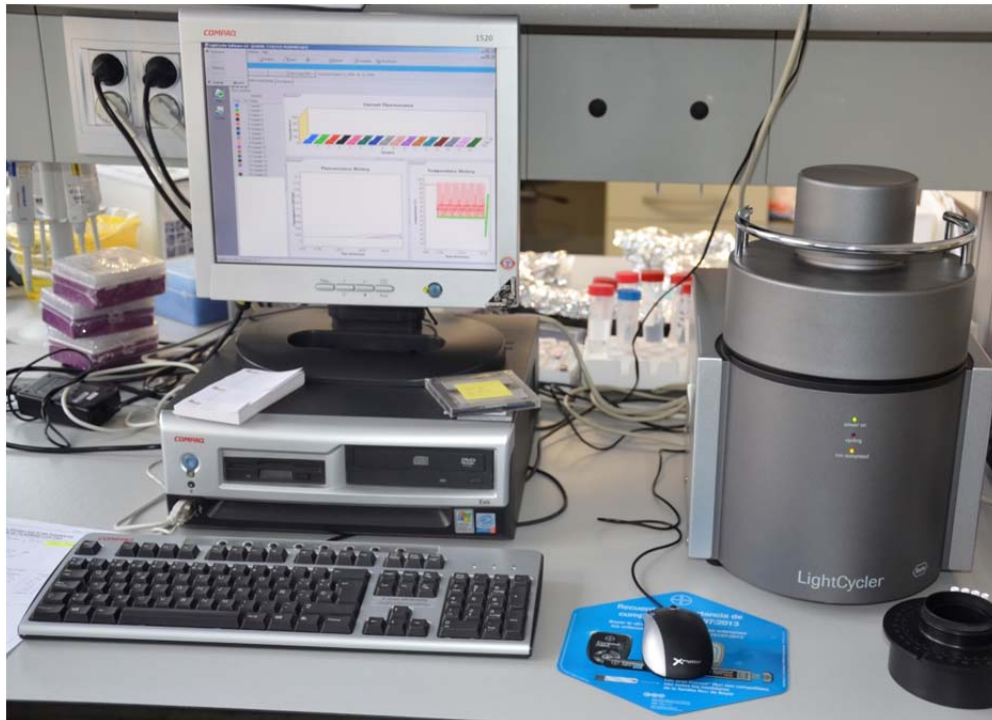


Fig. 11. Sistema LightCycler



Fig. 12. Sistema NanoDrop

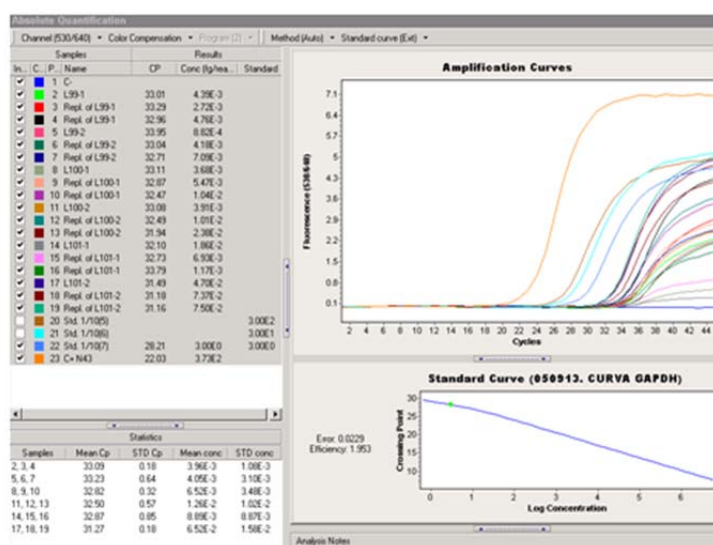
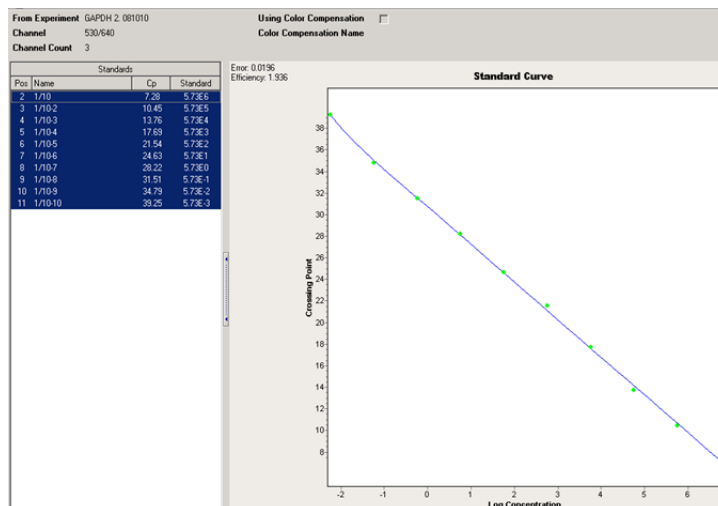
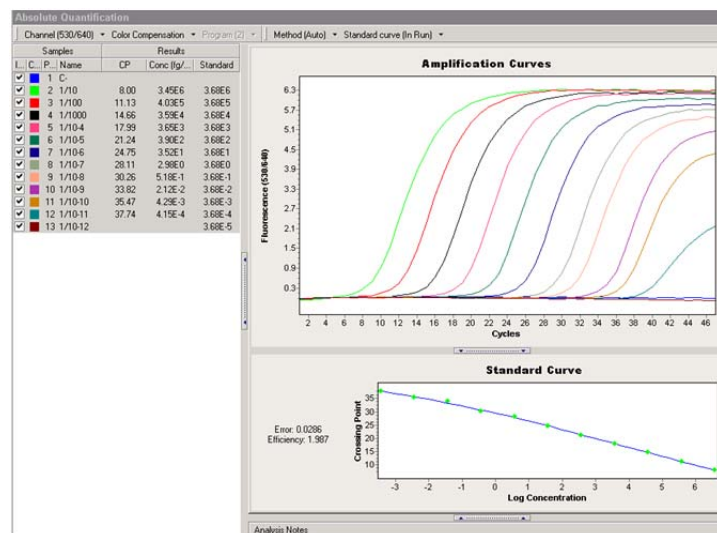


Fig. 13. Curvas standard

AMPLIFICACION DE ADNc de hTERT	
Secuencia de Cebadores	hTERT-upper: 5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3'
	hTERT-lower: 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'
Secuencia de Sonda Taqman	5'-6-carboxi-fluoresceína-
	CCCTGGTCCGAGGTGTGTCCCTGAG-6-carboxitetrametil-rodamina-3'
AMPLIFICACION DE ADNc de GAPDH	
Secuencia de Cebadores	GAPDH-upper:5'-GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC-3'
	GAPDH lower: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
Secuencia de Sonda Taqman	5'-6-carboxi-fluoresceína-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-6-
	carboxitetrametil-rodamina -3'

Tabla III. Secuencia de los cebadores y de la sonda Taqman utilizados para la amplificación del ADNc de la subunidad hTERT de la telomerasa y de la GAPDH.

3.4.7 Detección y cuantificación de hTERT ARNm en plasma

La retrotranscripción del ARN extraído del plasma se realizó por el mismo método descrito para los tejidos. Seguidamente, para la amplificación y cuantificación del ADNc, se aplicó también una técnica similar a la descrita para los tejidos, pero para establecer la cuantificación se incluyeron estándares de concentración conocida. Los niveles se obtuvieron en fentogramos (fg), que después se recalcularon en fg/ml de plasma.

Se generaron curvas estándar (Fig. 13) para el ADNc de hTERT a partir de diluciones seriadas de cantidades conocidas de secuencias idénticas a las que se pretendía amplificar. Estas secuencias se generaron mediante PCR (con la misma técnica descrita para tejidos), se purificaron empleando el *kit* “Montage DNA Gel Extraction” (Millipore, Bedford, EE.UU.), se cuantificaron mediante el sistema NanoDrop, y se realizaron diluciones seriadas entre 1/10 y 1/10¹², con las que se realizó una reacción de PCR en tiempo real, de la que se extrajo una curva estándar externa, que permitió relacionar el ciclo umbral de detección de

fluorescencia obtenido en cada muestra con la cantidad de ADNc diana que contenía. En cada PCR se incluyeron 4 estándares, eligiéndose después uno de ellos como referencia en la cuantificación con la curva estándar externa.

3.4.8 Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en tejidos y plasma

Es sabido que los niveles de expresión de GAPDH son prácticamente constantes, por lo que la detección de este ARNm sirvió para evaluar la eficiencia de la reacción de transcripción, así como la cantidad y calidad del ARN extraído. Además, inicialmente se pensó considerar la *ratio* entre las concentraciones de hTERT y las de GAPDH como valores normalizados de hTERT en cada muestra, ya que esta forma de cuantificación de la actividad telomerasa ha sido previamente propuesta por otros autores ([42](#), [105](#)).

De forma similar a lo expuesto para hTERT, se realizó la detección de ARNm de GAPDH en un grupo de 30 tejidos tumorales y 18 muestras de tejidos adyacentes, y se detectó y cuantificó esta misma secuencia en todas las muestras de plasma de los pacientes con cáncer y de los voluntarios sanos.

Para ello, tras realizar la retrotranscripción del ARNm (descrita en párrafos anteriores) se amplificó un fragmento de 226 pb del ADNc de GAPDH. Se emplearon también dos cebadores y una sonda Taqman específica, cuyas secuencias quedan detalladas en la Tabla III.

Cada muestra, tanto de tejido como de plasma, se analizó por triplicado, y la mezcla de reacción se hizo de forma similar a lo descrito para el ADNc de hTERT. Los ciclos de temperatura fueron 45, según el patrón descrito en la fig. 14.

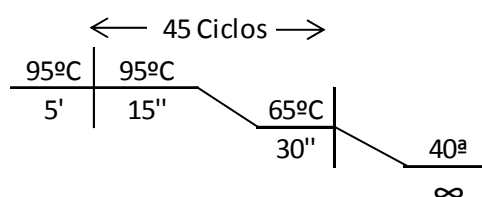


Fig. 14. Patrón de temperaturas empleado en la amplificación del ADNc de GAPDH.

De la misma forma que con hTERT, para cuantificar el ADNc plasmático se realizó una curva estándar específica, y en cada PCR se incluyeron 4 diluciones estándar. Las cantidades obtenidas fueron expresadas en fg, que después se recalcularon para obtener términos de concentración en plasma (fg/ml).

3.5 Análisis estadístico

3.5.1 Base de datos

Empleando el programa de análisis estadístico SPSS v.12 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.), se diseñó una base de recogida de datos que incluía, para cada paciente, los datos de filiación (iniciales del nombre y apellidos, fecha de nacimiento, sexo), número de historia clínica, antecedentes de neoplasia maligna previa, datos clínicos (diagnóstico y localización del tumor), estadificación clínica (cTNM), tipo de tratamiento quirúrgico del tumor índice, tipo del eventual tratamiento quirúrgico de las áreas ganglionares cervicales correspondientes (vaciamiento ganglionar cervical), clasificación anatomopatológica postquirúrgica (pTNM), estadio tumoral, eventual tratamiento adyuvante con radioterapia y/o quimioterapia postoperatoria, y evolución de los pacientes (fecha de diagnóstico y localización de una eventual recidiva local, recidiva ganglionar o metástasis a distancia), fecha y localización de un eventual segundo tumor primario y fecha y estado clínico del paciente en la última revisión en consulta. Además con este mismo método se realizó la gestión de la colección de tejidos tumorales y de la seroteca (fecha de recogida, cantidad de muestra, resultado de las determinaciones analíticas realizadas).

3.5.2 Variables

Para determinar el valor biológico y el significado clínico de la detección de ARNm tumoral se debe examinar en asociación con los datos clinicopatológicos conocidos, que se sabe que contribuyen al curso clínico de la enfermedad. En el caso del cáncer de laringe e hipofaringe, estas características son el grado T (extensión del tumor), grado N (presencia, tamaño y localización de los ganglios cervicales metastásicos) y presencia de metástasis a distancia.

De todos los datos recogidos, las variables que finalmente se analizaron estadísticamente en el grupo de los pacientes con cáncer fueron las siguientes:

1. Neoplasia previa.
2. Localización del tumor.
3. Estadio tumoral (pTNM; Estadios I, II, III, IV).
4. Tratamiento quirúrgico aplicado.
5. Seguimiento:
 - Recidiva local y/o regional.
 - Metástasis a distancia.
 - Supervivencia.
6. Concentración plasmática de hTERT ARNm antes de iniciar el tratamiento quirúrgico ([preQ-hTERT]) y en el postoperatorio a medio o largo plazo ([PostQ-hTERT]).
7. Concentración plasmática de GAPDH ARNm antes de iniciar el tratamiento quirúrgico ([PreQ-GAPDH]) y en el postoperatorio a medio o largo plazo ([PostQ-GAPDH]).
8. Concentración plasmática de ADN total antes de iniciar el tratamiento quirúrgico ([PreQ-ADN]) y en el postoperatorio a medio o largo plazo ([PostQ-ADN]).

En el grupo control se analizaron las concentraciones de hTERT ARNm y GAPDH ARNm en una sola muestra de plasma.

3.5.3 Análisis estadísticos

- Análisis descriptivo: se calcularon porcentajes en el caso de variables cualitativas, y medidas de tendencia central y dispersión para variables cuantitativas, con sus intervalos de confianza. En el caso de variables cuantitativas se consideraron, igualmente, índices de asimetría y grado de apuntamiento respecto de la ley normal, para comprobar la idoneidad en la aplicación de posteriores test estadísticos que exigen la normalidad de la distribución de las variables.

- Análisis bivalente: para estudiar la asociación o relación entre dos variables cualitativas se utilizaron pruebas de independencia (ji-cuadrado), verificándose las condiciones de aplicación. Cuando éstas no se cumplían, se usó la prueba exacta de Fisher. En el caso de una variable binaria y otra con más de dos categorías ordenadas, se aplicó la prueba de tendencia lineal de Mantel-Haensel. Para estudiar la relación entre una variable binaria y una cuantitativa, se empleó la prueba “t” de comparación de medias en grupos independientes. La hipótesis de igualdad de varianzas se verificó con la prueba F basada de Snedecor. Por último, se utilizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney) cuando la distribución de alguna de las variables presentaba marcadas anomalías (asimetría, etc.) o al comparar grupos pequeños, cuando se vulneraban los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas.

La comparación de medidas repetidas (pre y postquirúrgicas), se realizó mediante la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. El estudio de correlación entre las determinaciones plasmáticas se realizó con la Rho de Spearman.

Por último, se empleó el método de Kaplan-Maier para calcular las curvas de distribución de supervivencia. La comparación de estas curvas entre pacientes con distintos niveles de ácidos nucleicos plasmáticos se realizó mediante el “Log Rank test”.

Todos los análisis se realizaron con el mencionado programa informático SPSS v. 12, y se añadió un estudio de valor diagnóstico de la detección de hTERT ARNm empleando el programa informático Epidat, versión 3.1 (Xunta de Galicia, España).

3.6 Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado previamente por el Comité Ético de Investigación Clínica del CHUA. Tanto a los pacientes que formaron parte de este estudio, como a los voluntarios sanos, se les especificó de forma verbal y escrita el objetivo de la toma de muestras para investigación, garantizándoles la voluntariedad y confidencialidad del mismo y solicitándoseles, como se ha descrito anteriormente, la firma del consentimiento informado (Anexo I).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

4.1 Variables clínicas

En el presente estudio participaron un total de 49 pacientes con neoplasia maligna: 47 con cáncer de laringe y 2 con cáncer de hipofaringe. La biopsia reveló en todos los casos un carcinoma escamoso. Como control participaron 27 sujetos sanos sin antecedentes de cáncer ni enfermedad maligna conocida en el momento de su participación en el estudio.

Los principales datos demográficos y anatomoclínicos de los pacientes con cáncer se muestran resumidos en la Tabla IV, y pormenorizados por casos en el anexo II.

EDAD (años; media ± d.e.)	SEXO		LOCALIZACIÓN DE LOS TUMORES			
	V	M	SG	G	HF	
65,5 ± 11,2	47 (95,9%)	2 (4,1%)	24 (49%)	23 (46,9%)	2 (4,1%)	
ESTADIFICACIÓN DE LOS TUMORES						
T	N	M	I	II	III	IV
T1: 9 (18,4%)	N0: 30 (61,2%)	M0: 49 (100%)	8 (16,3%)	5 (10,2%)	11 (22,4%)	25 (51%)
T2: 8 (16,3%)	N1: 5 (10,2%)					
T3: 18 (36,7%)	N2: 13 (26,5%)					
T4: 14 (28,6%)	N3: 1 (2%)					

Tabla IV. Resumen de los principales datos demográficos y anatomoclínicos de los pacientes con cáncer reclutados en este estudio (n = 49). Los datos se expresan en número de casos y porcentajes, excepto la edad, que se expresa en media ± desviación estándar (d.e.). V: Varón; M: Mujer. SG: supraglotis; G: glotis; HF: hipofaringe.

Como se observa en la Tabla IV, la gran mayoría de los pacientes fueron varones, con una edad media superior a los 65 años. La localización del tumor, dentro de la laringe, fue supraglótica y glótica casi a partes iguales, y los más infrecuentes fueron los tumores hipofaríngeos.

Nueve casos (18,4%) tenían antecedentes de neoplasia maligna previa. Respecto al grado tumoral, en el momento del diagnóstico la mayor parte de los pacientes (65,3%) se encontraban en un grado avanzado de la enfermedad (T3 y T4). Respecto la afectación de los ganglios linfáticos de cuello, más de la mitad de los casos (61,2%) fueron clasificados como N0. En ningún paciente se encontraron metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. Es de señalar que cerca de 3/4 de los pacientes (73,4%) se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad (III ó IV).

En todos los pacientes se indicó un tratamiento quirúrgico con intención curativa. En 33 pacientes (67,3%) además del tratamiento del tumor índice, se añadió un vaciamiento cervical de las áreas ganglionares cervicales correspondientes. En el 53,1 % de los pacientes se añadió en el postoperatorio una terapia adyuvante, con radioterapia y/o quimioterapia.

El seguimiento medio de los pacientes con cáncer fué de $34,0 \pm 22,2$ meses, y se comenzó a computar desde el momento de la intervención quirúrgica. Durante el seguimiento, 6 pacientes (12,2%) sufrieron recidiva local y/o regional (en los ganglios del cuello), y en 8 pacientes (16,3%) se diagnosticaron metástasis a distancia. En 3 pacientes (6,1%) apareció una segunda neoplasia maligna.

Al final del periodo de seguimiento, 35 pacientes (71,4%) vivían sin enfermedad neoplásica detectable, 3 pacientes (6,1%) vivían con enfermedad neoplásica, 8 pacientes (16,3%) habían fallecido por causa oncológica y 3 pacientes (6,1%) habían fallecido sin causa oncológica conocida.

En el grupo control, se reclutaron 24 hombres (88,8%) y 3 mujeres (11,1%) sin enfermedad neoplásica conocida. La edad media fue de $60,1 \pm 12,4$ años. No hubo diferencias significativas en cuanto a edad y sexo entre el grupo de pacientes con cáncer y el grupo control.

En las figuras 15 a 26 aparecen representados gráficamente, en forma de diagrama de barras y sectores, los datos anatomoclínicos más importantes de los sujetos incluidos en el presente estudio.

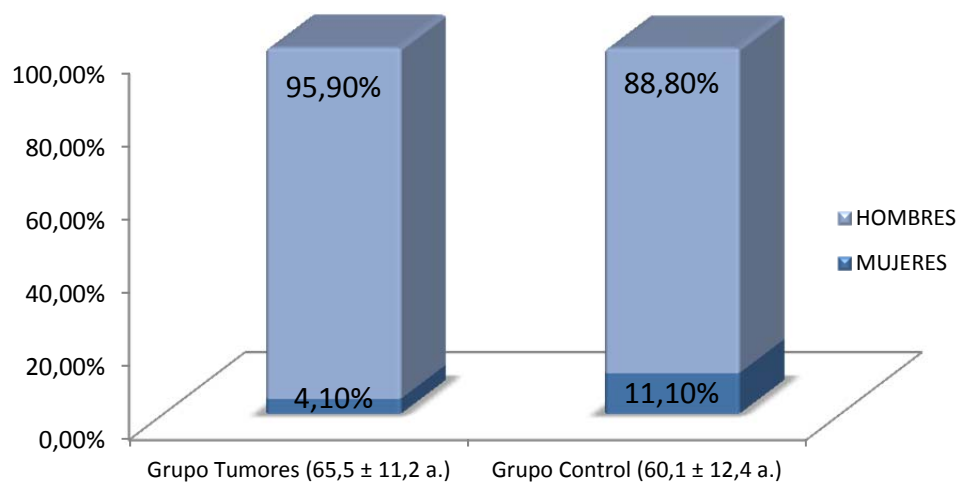


Fig. 15. Distribución por sexo de los pacientes con cáncer y voluntarios sanos; a: años (media \pm d.e.).

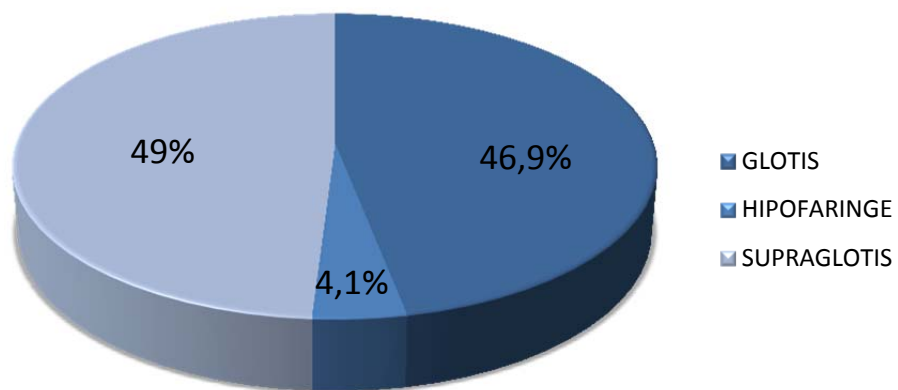


Fig. 16. Localización del tumor dentro de la vía aerodigestiva superior.

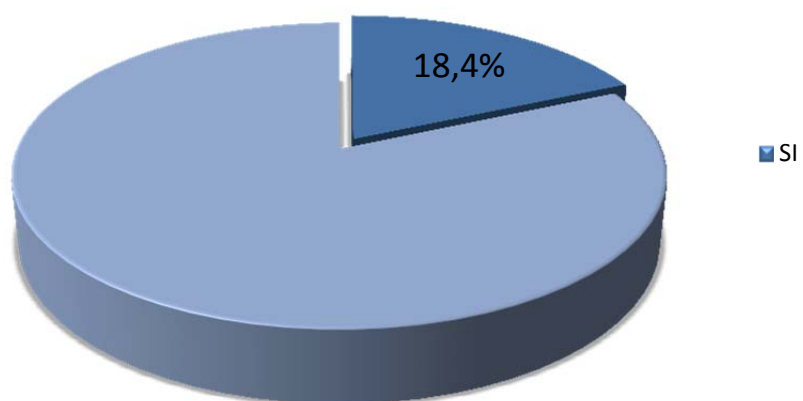


Fig. 17. Porcentaje de pacientes con antecedentes de neoplasia maligna previa.

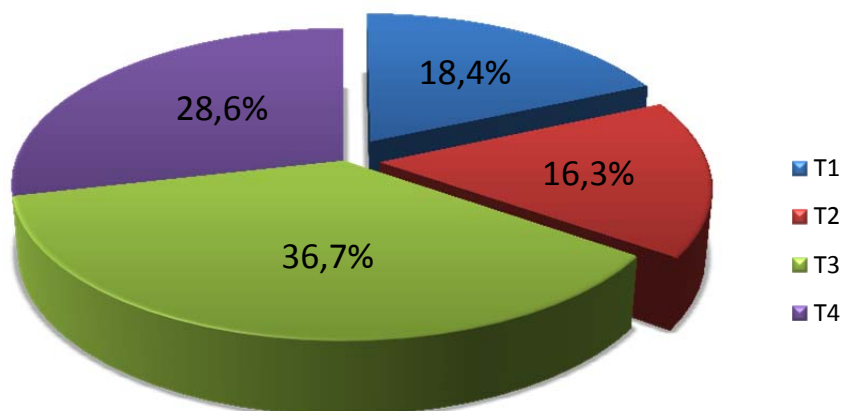


Fig. 18. Distribución de los pacientes según el grado tumoral T.

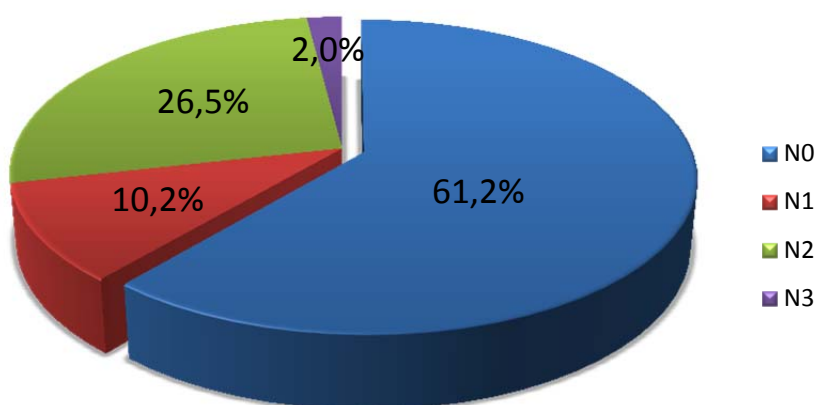


Fig. 19. Distribución de los pacientes según el grado tumoral N.

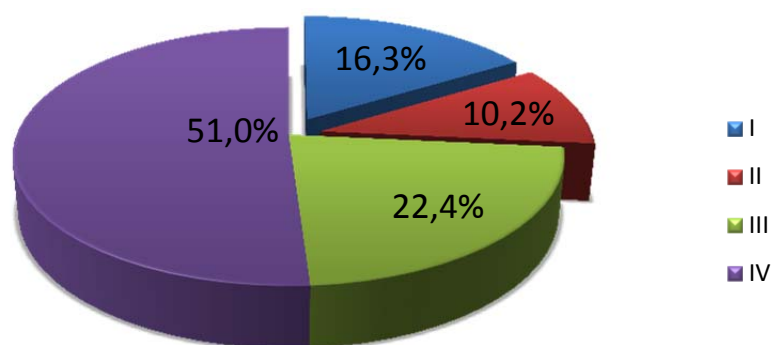


Fig. 20. Distribución de los pacientes según el estadio tumoral.

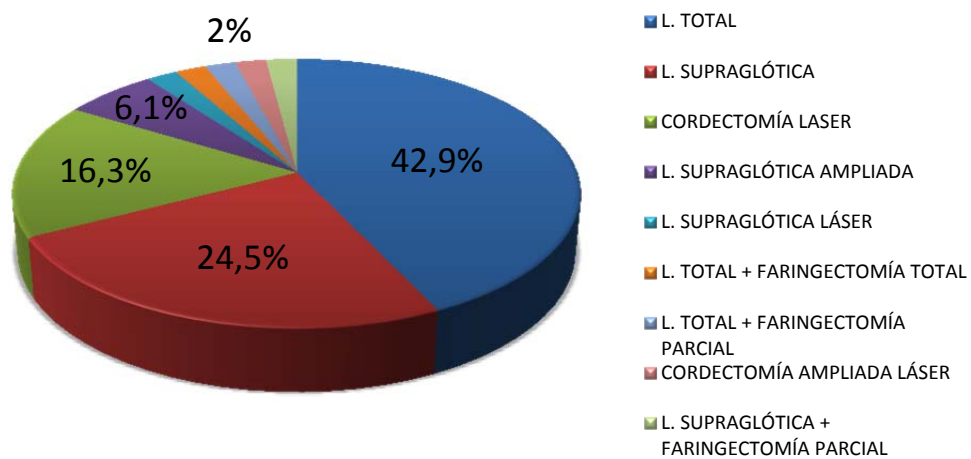


Fig. 21. Distribución de los pacientes según la técnica quirúrgica empleada.

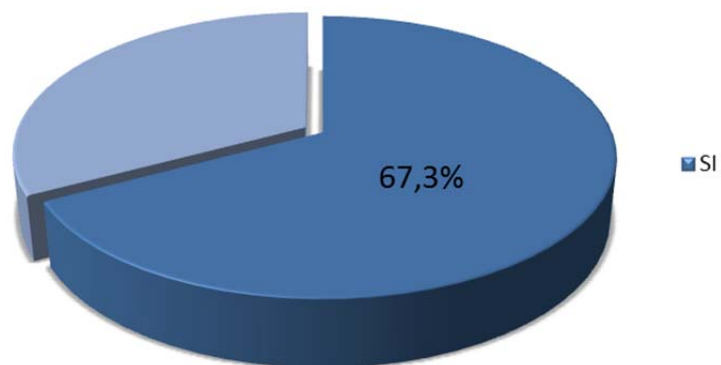


Fig. 22. Porcentaje de pacientes en que se realizó vaciamiento cervical .

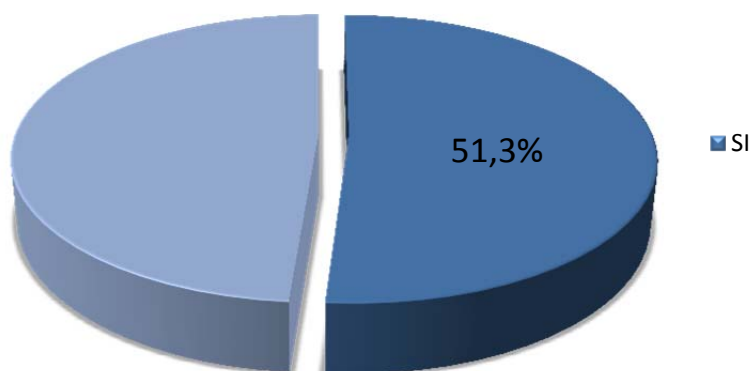


Fig. 23. Porcentaje de pacientes en que se añadió radioterapia y/o quimioterapia.

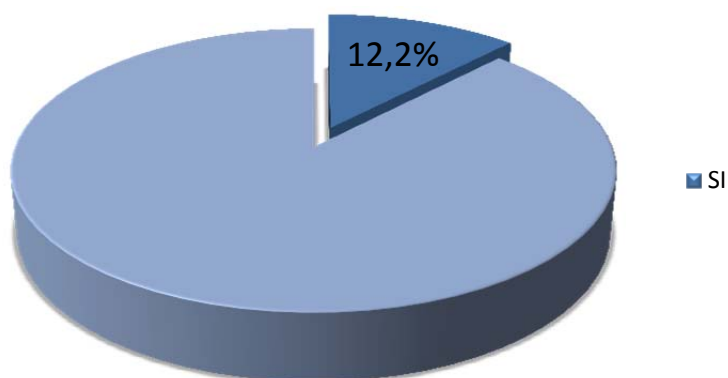


Fig. 24. Porcentaje de pacientes en que apareció recidiva local y/o regional durante el seguimiento.

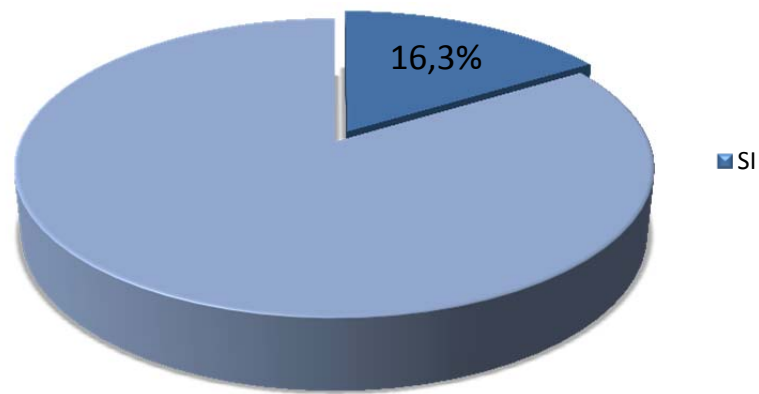


Fig. 25. Porcentaje de pacientes en que aparecieron metástasis a distancia durante el seguimiento.

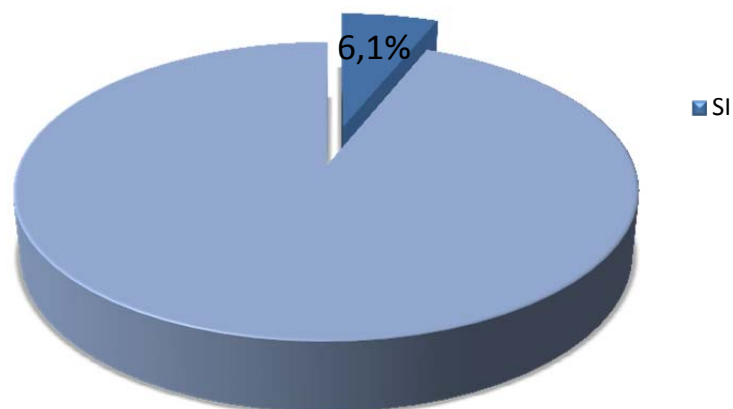


Fig. 26. Porcentaje de pacientes en que apareció un segundo tumor durante el seguimiento.

4.2 Detección de hTERT ARNm y GAPDH ARNm en tejidos

En la Tabla V se muestran los resultados de los análisis moleculares de los tumores, y de las muestras de tejidos adyacentes.

	TEJIDO TUMORAL (n = 30)		TEJIDO ADYACENTE (n = 18)	
hTERT	+ 100%	1 réplica: 3,4 %	+ 72,2%	1 réplica: 23,1 %
		2 réplicas: 13,8 %		2 réplicas: 7,7 %
		3 réplicas: 80,0 %		3 réplicas: 69,2 %
	- 0%		- 27,8%	
GAPDH	+ 100%	3 réplicas: 100 %	+ 100%	3 réplicas: 100 %

Tabla V. Detección de ARNm de hTERT y de GAPDH en muestras de tejidos. Se muestran los porcentajes de casos positivos (+) y negativos (-). De cada muestra se analizaron 3 réplicas, y en esta tabla figuran los porcentajes de muestras que resultaron positivas en una, dos o las tres réplicas.

Como se muestra en esta tabla, la detección de hTERT ARNm fue más frecuente en tejidos tumorales (100%) que en los tejidos adyacentes con aspecto macroscópico normal (72,2%). Además, en la mayoría de las muestras de tumor (80,0%) el resultado fue positivo en sus tres réplicas, lo que indica más altos niveles de expresión hTERT ARNm.

Con respecto al GAPDH ARNm, pudo detectarse en todos los tejidos y en todas las réplicas, sin distinción entre tejidos tumorales y adyacentes.

4.3 Detección y cuantificación de hTERT ARNm en plasma

Antes de realizar el análisis estadístico de las variables de mayor interés, comparamos los resultados obtenidos en muestras plasmáticas preoperatorias entre pacientes con neoplasia previa (n = 9) y sin ella (n = 40). No se observó

diferencia estadísticamente significativa en ninguna variable relacionada con la detección y cuantificación de ARNm (tanto de hTERT como de GAPDH) ni de ADN en plasma, por lo que para este análisis se incluyeron todos los casos en un solo grupo.

Asimismo, realizamos un análisis de correlación entre los niveles de hTERT ARNm y GAPDH ARNm, tanto preoperatorios como postoperatorios, por separado y también en un solo grupo que incluyó todos. No se encontró ninguna correlación estadística, por lo que se decidió no realizar la normalización de los niveles de hTERT ARNm respecto a los de GAPDH, como sugieren algunos autores, sino tratarlos como variables independientes.

4.3.1 Detección y cuantificación de hTERT ARNm en muestras preoperatorias de plasma

En la Tabla VI y de forma pormenorizada en los anexos III y IV se muestran los principales resultados de la detección de hTERT ARNm en el plasma de los pacientes con cáncer y voluntarios sanos, que desglosaremos a continuación.

	PLASMAS PRE-Qx (n = 49)		PLASMAS POST-Qx	
			Temprano (n = 38)	Tardío (n = 10)
Total pacientes	11 (22,4%)		10 (26,3%)	4 (40%)
SG	8/24 (33,3%)	p = 0,02	5/20 (25%)	1/3 (33,3%)
G	2/23 (8,7%)		4/17 (23,5%)	2/6 (33,3)
HF	1/2 (50%)		1/1 (100%)	1/1 (100%)
Voluntarios sanos (n = 27)	0		Pacientes Voluntarios	p = 0,006

Tabla VI. Detección de hTERT ARNm en el plasma de pacientes con cáncer y voluntarios sanos. Los datos se expresan en número de casos positivos y porcentajes. PRE-Qx: preoperatorio; POST-Qx: postoperatorio. SG: supraglotis; G: glotis; HF: hipofaringe.

Como se observa, ninguno de los 27 voluntarios sanos dió resultado positivo a la detección de hTERT ARNm. Sin embargo, sí se detectó en 11 pacientes (22,4%) con cáncer en las muestras de plasma extraídas previamente a la intervención quirúrgica. Con el test estadístico exacto de Fisher se encontró que esta diferencia era estadísticamente significativa ($p = 0,006$).

Con estos resultados se analizó el valor diagnóstico de la detección de hTERT ARNm en plasma y se obtuvo una sensibilidad de 22,45 % [9,75% - 35,15%], una especificidad del 100% [98,08 % – 100%,] con un índice de validez de 49,33% [37,35% - 61,31%], un valor predictivo positivo de 100 % [95,45% - 100%] y un valor predictivo negativo de 40,63% [27,81 % -53,44%], con un nivel de confianza del 95%. Se construyó una curva ROC, y se calculó la superficie bajo la misma que fue igual a 0,612 (Fig.27).

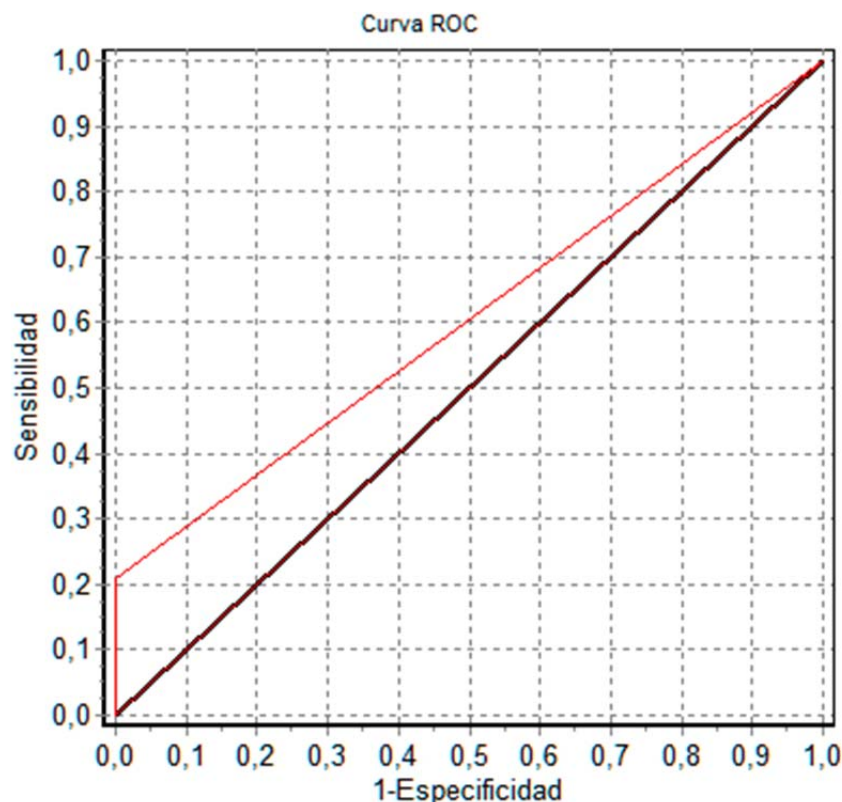


Fig. 27. Curva ROC. Valor diagnóstico de la detección de hTERT ARNm en la muestra de plasma preoperatoria de los pacientes con cáncer .

Respecto a la localización del tumor, la detección de hTERT ARNm en el plasma preoperatorio fue significativamente más frecuente en los tumores supraglóticos que en los glóticos ($p = 0,02$). Sin embargo, no se encontró relación estadísticamente significativa entre esta detección y el grado tumoral T, N o el estadio tumoral, ni comparando cada estadio por separado, ni agrupándolos (por ejemplo, T1+T2 vs. T3 +T4; N0 vs. N1+N2+N3; I + II vs III + IV).

Se valoró si la detección de hTERT ARNm en la muestra preoperatoria se relacionaba con el desarrollo posterior recidiva local y/o regional, y sí se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p = 0,02$). Asimismo, se analizó si esta detección se relacionaba con la aparición de metástasis a distancia en el curso de la enfermedad, y no se encontró relación estadísticamente significativa, aunque el valor de “p” no distaba mucho de la significación ($p= 0,06$). También se valoró si había relación con la aparición de una segunda neoplasia maligna en el seguimiento, y tampoco se encontró asociación estadística.

Respecto a la cuantificación de hTERT ARNm en la muestra preoperatoria de plasma de los pacientes con cáncer, los niveles obtenidos se muestran en la Tabla VII y en el anexo III.

	PLASMAS PRE-Q (fg/ml; n = 48)	PLASMAS POST-Q (fg/ml)	
		Temprano (n = 38)	Tardío (n = 10)
Total pacientes	$\bar{X} : 0,221 \pm 0,775$ $M_e: 0$	$\bar{X} : 0,260 \pm 0,446$ $M_e: 0$ (n=20)	$\bar{X} : 0,274 \pm 0,441$ $M_e: 0$ (n=3)
(n = 22) SG	$\bar{X} : 0,431 \pm 1,084$ $M_e: 0$	$\bar{X} : 0,662 \pm 1,900$ $M_e: 0$ (n=17)	$\bar{X} : 0,186 \pm 0,322$ $M_e: 0$ (n=6)
(n = 23) G	$\bar{X} : 0,030 \pm 0,140$ $M_e: 0$	$\bar{X} : 0,696 \pm 1,938$ $M_e: 0$ (n=1)	$\bar{X} : 0,194 \pm 0,430$ $M_e: 0$ (n=1)
(n = 2) HF	$\bar{X} : 0,002 \pm 0,003$ $M_e: 0,002$	$\bar{X} : 0,013$	$\bar{X} : 1,022$

Tabla VII. Niveles plasmáticos de hTERT ARNm en pacientes con cáncer. Los datos se expresan en media (\bar{X}) \pm desviación estándar (d.e.) y mediana (M_e). PRE-Qx: preoperatorio; POST-Qx: postoperatorio. SG: supraglotis; G: glotis; HF: hipofaringe.

Para el cálculo estadístico, se dio valor 0 a los casos en los que no se detectó hTERT ARNm.

No se encontró relación entre los niveles plasmáticos de hTERT ARNm y el grado tumoral T, N ó estadio tumoral, ni comparando cada estadio por separado, ni agrupándolos, como se explicaba anteriormente. Sin embargo, estos niveles resultaron más elevados en los casos de tumores supraglóticos, con una relación estadística próxima a la significación ($p = 0,055$).

Por el contrario sí se encontró relación estadísticamente significativa entre los niveles plasmáticos preoperatorios de ARNm hTERT y la aparición posterior de recidiva local y/o regional ($p = 0,046$) y de metástasis a distancia ($p = 0,047$). Aunque no se encontró tal relación con la aparición de una segunda neoplasia maligna.

4.3.2 Detección y cuantificación de hTERT ARNm en muestras postoperatorias de plasma

En la cohorte de pacientes en los que se analizó el ARNm plasmático en el periodo postoperatorio medio (entre 28 y 49 días tras la cirugía), no se encontró asociación estadística entre la detección de hTERT ARNm y el desarrollo posterior de recidiva local y/o regional, ni de metástasis a distancia. Tampoco se encontró en los pacientes analizados en el postoperatorio tardío (entre 58 y 223 días). Sin embargo, si se incluían todos en un solo grupo sí se observó que la relación entre la detección de hTERT ARNm plasmático en el postoperatorio y el desarrollo posterior de recidiva estaba cercana a la significación estadística ($p = 0,052$).

Respecto al análisis cuantitativo, se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles pre y postoperatorios de hTERT ARNm ($r = 0,352$, $p = 0,03$). Los niveles postoperatorios de hTERT ARNm plasmático se incrementaron significativamente respecto a los preoperatorios ($p = 0,04$; Tabla VII).

No se encontró asociación estadística entre los niveles postoperatorios de ARNm hTERT y el desarrollo posterior de recidiva local y/o regional, ni de metástasis a distancia.

Tampoco se encontró asociación estadística entre estas variables clínicas y el cambio sufrido en los niveles plasmáticos de ARNm hTERT entre el pre y el postoperatorio. Por último, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los niveles obtenidos en el postoperatorio temprano y tardío. Tratando estos últimos por separado, tampoco se les encontró relación estadística con ninguna variable de evolución clínica.

4.4 Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en plasma

4.4.1 Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en las muestras preoperatorias de plasma

En la Tabla VIII y en los anexos III y IV se recogen los resultados de la detección y cuantificación de GAPDH ARNm en las muestras de plasma de pacientes con cáncer y voluntarios sanos.

	PLASMAS PRE-Qx (fg/ml; n = 47)	PLASMAS POST-Qx (fg/ml)	
		Temprano (n = 37)	Tardío (n = 9)
Total pacientes	\bar{X} : 723,456 ± 2188,434 M _e : 70,720	\bar{X} : M _e :46,500 (n=19)	\bar{X} : 132,986 ± 117,870 M _e : 157,76
(n = 23) SG	\bar{X} : 10441,300 ± 3135,120 M _e : 44,000	\bar{X} : 955,754 ± 2978,953 M _e : 29,000 (n=17)	\bar{X} : 80,608 ± 109,109 M _e : 80,608 (n=6)
(n = 23) G	\bar{X} : 469,025 ± 657,478 M _e : 93,500	\bar{X} : 773,054 ± 2001,585 M _e : 82,250 (n=1)	\bar{X} : 140,342 ± 133,983 M _e : 123,920 (n=1)
(n = 2) HF	\bar{X} : 153,12 ± 156,808 M _e : 153,120	\bar{X} : 4,130	\bar{X} : 193,600
Voluntarios sanos (n = 27)	\bar{X} : 20,120 ± 30,830 M _e : 7,750	Pacientes } Voluntarios } P=0,001	

Tabla VIII. Niveles plasmáticos de GAPDH ARNm en pacientes con cáncer y voluntarios sanos. Los datos se expresan en media (\bar{X}) ± d.e y mediana (M_e). PRE-Qx: preoperatorio; POST-Qx: postoperatorio. SG: supraglotis; G: glotis; HF: hipofaringe.

□

Los niveles plasmáticos de GAPDH ARNm fueron significativamente superiores en pacientes con cáncer que en voluntarios sanos (p = 0,001).

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre los niveles preoperatorios de GAPDH ARNm plasmático y el grado tumoral T, N ó estadio tumoral, ni analizando cada estadio por separado, ni agrupándolos. Tampoco se encontró relación con la localización del tumor, la aparición de recidiva local y/o regional, de metástasis a distancia o de una segunda neoplasia en el curso de la enfermedad.

4.4.2 Detección y cuantificación de GAPDH ARNm en las muestras postoperatorias de plasma

En la cohorte de pacientes en los que se analizó el GAPDH ARNm plasmático en el periodo postoperatorio medio (entre 28 y 49 días), se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles pre y

postoperatorios ($r = 0,806$, $p < 0,001$). En general, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles pre y postoperatorios de GAPDH ARNm plasmático. Sin embargo, seleccionando sólo aquellos pacientes en los que en la intervención quirúrgica se realizó una corpectomía láser ($n = 9$), el incremento de estos niveles en el postoperatorio sí fue estadísticamente significativo ($392,1 \pm 670,4$ vs. $1348,7 \pm 2685,3$; $p = 0,02$).

No se encontró asociación estadística entre los niveles postoperatorios de GAPDH ARNm y el desarrollo posterior de recidiva local y/o regional, o metástasis a distancia.

Tampoco se encontró asociación estadística entre estas variables clínicas y el cambio sufrido en los niveles plasmáticos de GAPDH ARNm entre el pre y el postoperatorio.

Por último, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los niveles obtenidos en el postoperatorio medio y tardío. Tratando estos últimos por separado, tampoco se les encontró relación estadística con ninguna variable de evolución clínica.

4.5 Cuantificación de ADN en plasma

En una cohorte de 19 pacientes con cáncer se realizaron determinaciones de ADN en las muestras de plasma preoperatorias y postoperatorias. En la Tabla IX y Anexo III se muestran los resultados obtenidos en su cuantificación.

*p=0,02	PLASMAS PRE-Q ($\mu\text{g/ml}$; media \pm d.e.n = 19)	PLASMAS POST-Qx ($\mu\text{g/ml}$)	
		Temprano (n = 9)	Tardío (n = 10)
Total pacientes	\bar{X} : 50,30 \pm 17,23* Me: 54,70	\bar{X} : 57,65 \pm 16,26 Me: 60,21 (n=6)	\bar{X} : 61,50 \pm 15,90* Me: 61,90 (n=3)
(n = 9) SG	\bar{X} : 48,06 \pm 15,30 Me: 52,00	\bar{X} : 57,55 \pm 14,78 Me: 57,50 (n=2)	\bar{X} : 52,65 \pm 16,01 Me: 61,57 (n=6)
(n = 9) G	\bar{X} : 55,90 \pm 17,42 Me: 56,30	\bar{X} : 70,49 \pm 8,20 Me: 70,49 (n=1)	\bar{X} : 67,92 \pm 14,99 Me: 72,08 (n=1)
(n = 2) HF	\bar{X} : 38,00 \pm 27,29 Me: 38,00	\bar{X} : 32,60	\bar{X} : 49,50

Tabla IX. Niveles plasmáticos de ADN en pacientes con cáncer. Los datos se expresan en media \pm d.e. PRE-Qx: preoperatorio; POST-Qx: postoperatorio. SG: supraglotis; G: glotis; HF: hipofaringe.

Los niveles pre y postoperatorios mostraron una correlación positiva estadísticamente significativa ($r = 0,705$, $p = 0,001$). En general, los niveles encontrados en el postoperatorio fueron superiores a los del preoperatorio, pero esta diferencia sólo fue estadísticamente significativa cuando se compararon las concentraciones en plasma de la muestra preoperatoria con aquellas muestras extraídas en el postoperatorio tardío (entre 58 y 223 días; $p = 0,02$).

Los niveles de ADN plasmático en el postoperatorio medio tuvieron una relación con el desarrollo posterior de recidiva y de metástasis cercana a la significación estadística ($p = 0,056$ en ambos casos). Por lo demás, no se encontró relación estadísticamente significativa entre los niveles de ADN plasmático (ni pre ni postoperatorio) con ninguna variable clínica, ni en el momento del diagnóstico ni durante el seguimiento posterior.

4.6 Análisis estadístico específico para la supervivencia

Dado que la detección de hTERT ARNm fue negativa en un alto número de muestras de plasma, se decidió escoger como índice a relacionar con la supervivencia no la concentración absoluta, sino la frecuencia de detección (sí/no) de hTERT ARNm en el plasma.

Empleando la prueba “Log-Rank (Mantel-Cox)” se comprobó que la detección de hTERT ARNm en la muestra de plasma preoperatoria en los pacientes con cáncer no tenía relación estadísticamente significativa con la supervivencia. Tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa con la supervivencia la detección de hTERT ARNm en las muestras de plasma obtenidas en el postoperatorio medio (entre 28 y 49 días). Por el contrario, sí se demostró una relación estadísticamente significativa, con disminución de la supervivencia, la detección de hTERT ARNm en el plasma de los pacientes en los que se había extraído la muestra de plasma en el periodo postoperatorio tardío (entre 58 y 223 días)($p = 0,002$)(Fig. 28), así como la detección de hTERT ARNm en el plasma postoperatorio de todos los pacientes con cáncer, independientemente del momento en que se había extraído la muestra de plasma ($p = 0,004$) (Figura 29).

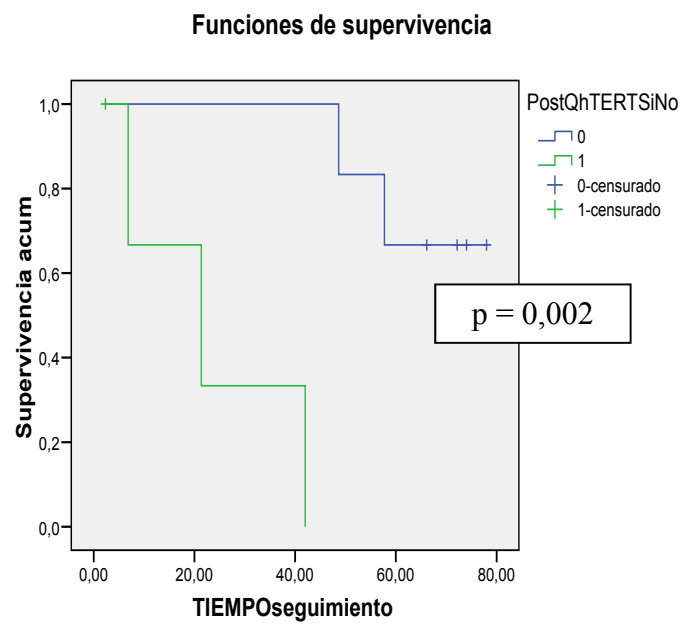


Fig. 28. Curva de supervivencia de los pacientes con cáncer en los que se detectó hTERT ARNm, y cuya muestra de plasma fue extraída en el periodo postoperatorio tardío (entre 58 y 223 días).

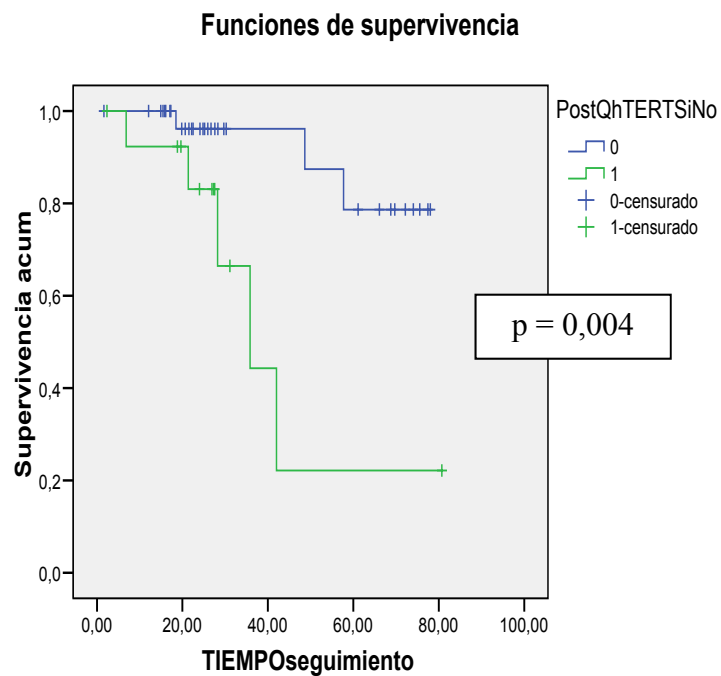


Fig. 29. Curva de supervivencia de los pacientes con cáncer, en los que se detectó hTERT ARNm en la muestra de plasma postoperatoria.

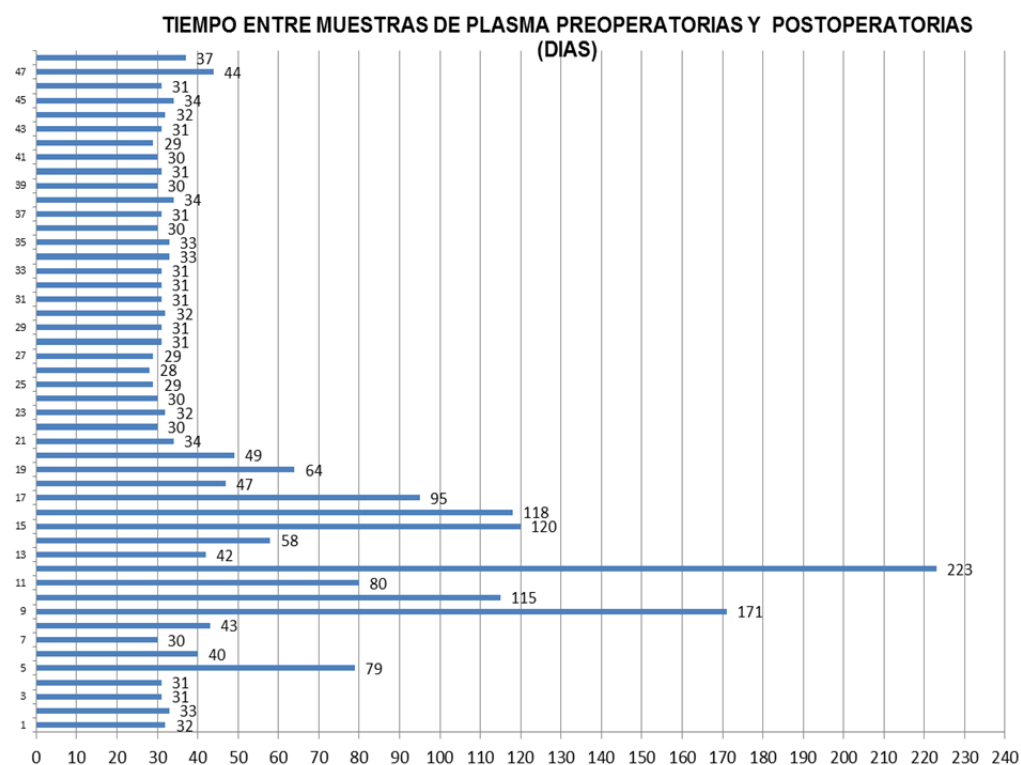


Fig. 30. Tiempo (en días), para cada paciente, entre la muestra de plasma preoperatoria y la muestra de plasma postoperatoria.

Respecto a los niveles de GAPDH ARNm plasmático, se categorizó estableciendo un umbral, que coincidió con el valor de la mediana. En el caso de la muestra de plasma preoperatoria este valor fue de 70,7 fg/ml y en la muestra postoperatoria de 56,5 fg/ml. De acuerdo a estas categorías, y aplicando la prueba “Log Rank (Mantel-Cox)” no se encontró relación estadísticamente significativa entre la concentración de GAPDH ARNm de estas muestras y la supervivencia. Tampoco se encontró relación entre los niveles de ADN plasmáticos y la supervivencia, estableciendo el umbral en la mediana, que en este caso fue de 54,7 µg/ml.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

5.1 Técnicas elegidas para el estudio de los ácidos nucleicos plasmáticos en el cáncer de laringe e hipofaringe

5.1.1 Técnicas para la detección y cuantificación de ARN circulante total y tumoral

Aunque el ARN es detectable en plasma y suero, y se desconoce su estabilidad en este medio, se considera más lábil que el ADN, especialmente por la presencia de ribonucleasas en la sangre (175). El efecto de las ARNasas en este medio puede ser demostrado por un experimento de labilidad de ARN libre, que mostró que más del 99% de este añadido a la muestra era degradado después de 15 segundos de incubación. Esta labilidad contrasta con la estabilidad real del ARN en plasma o suero, lo que sugiere que este está protegido mediante algún mecanismo (102). Por otro lado se desconoce si diferentes especies de ARNm en el plasma o suero tienen diferente estabilidad.

En general, para la detección de CNA es imprescindible el control de la fase pre-analítica; es decir, el control de los diferentes factores existentes entre la toma de la muestra y el análisis de los CNA: anticoagulante empleado, tiempo y temperatura de conservación, número de centrifugaciones, etc. (176-182). Estos factores pueden influir de manera decisiva sobre la calidad y precisión de los datos, aunque en los últimos años se han realizado progresos para una mejor definición de los factores que influyen en el proceso y almacenamiento de la muestra (183-185) .

Para optimizar los resultados, algunos autores han realizado algunas recomendaciones cuando se trabaja con ARN, como prestar atención extrema a cada paso del procesamiento del material, y a la manipulación e interpretación de los datos. Además se propugna comprobar la calidad del ARN obtenido antes de usarlo sobre el gel de agarosa para electroforesis, y alicuotar las muestras para

reducir la degradación al máximo, comprobar la precisión de los instrumentos del laboratorio, usar en el análisis de resultados las pruebas estadísticas no paramétricas mejor que paramétricas (ej. Mann-Whitney), y repetir al menos 3 veces las pruebas para cada condición (186).

Teóricamente, para mantener la integridad del ARN, el tiempo y los pasos entre la venopunción y la extracción del ARN debe reducirse al mínimo (102). En el presente estudio, desde la extracción de las muestras y la centrifugación no pasaron más de 4 horas, el aislamiento del plasma se realizó tras dos centrifugaciones, y la conservación hasta la extracción del ARN o la cuantificación del ADN se realizó a -80°C.

Se ha debatido mucho sobre la idoneidad bien del plasma o del suero para el estudio de los CNA (66, 177). En el presente estudio empleamos plasma, basándonos en la experiencia previa de nuestro grupo (69, 70, 79), y en estudios de otros autores como el de Thijssen *et al.* (2002), en el que se realizó una comparación cuantitativa de muestras pareadas de ADN plasmático y sérico en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal. Los niveles de ADN en plasma y suero no estaban correlacionados. Además, mientras que el ADN sérico estaba significativamente asociado con la presencia de metástasis, sólo el ADN plasmático fue predictivo de recurrencia. En la mayoría de los pacientes, las cantidades de ADN sérico fueron mayores que en plasma. Se concluyó que el ADN sérico podría representar un proceso tumoral indirecto, mientras que el ADN plasmático refleja mejor los niveles *in vivo* del ADN circulante (66).

A lo largo de las últimas décadas, se han descrito diferentes métodos para la detección y cuantificación de CNA: radioinmunoensayo (35, 187), PCR competitiva (61), PCR cuantitativa en tiempo real (66), PCR digital (188), fluorimetría (66), espectrofotometría (88) ó comparación visual con estándares conocidos (84).

Los primitivos métodos como el RIA podían detectar ADN sólo en el rango de ng (35). La baja concentración de los extractos de cfADN hace problemática la cuantificación del sustrato usando otros métodos como espectroscopia ultravioleta o la espectroscopia de fluorescencia (62).

Las tecnologías basadas en PCR pueden amplificar copias de ADN para detectar y cuantificar cantidades extremadamente pequeñas de ácidos nucleicos, en el rango de picogramos o incluso fentogramos, siendo una herramienta útil en oncología (40). Actualmente están disponibles muchas metodologías para el análisis de las alteraciones genómicas, tales como la mencionada PCR digital, y la basada en el uso de sondas que bloquean las secuencias no mutadas, permitiendo detectar y amplificar exclusivamente las mutadas (por ejemplo, sondas PNA que son particularmente apropiadas para el análisis de mutaciones en el cfADN) (67, 70, 79).

En el presente estudio, tras la retrotranscripción del ARN, se empleó una técnica de PCR cuantitativa en tiempo real con sondas Taqman, descrita en estudios anteriores (105). El desarrollo de esta tecnología ha hecho posible una cuantificación fiable, monitorizando toda la reacción PCR mediante la detección de fluorescencia, al permitir la medida del comienzo de la fase exponencial de amplificación (189). Esta técnica fue relativamente sencilla de reproducir, y realizando ajustes para un rendimiento óptimo, conseguimos detectar hasta 0,0003 fg/ml de plasma. Dado que los autores que la desarrollaron no expresaron sus resultados en valores absolutos de concentración, sino normalizados frente a las concentraciones de GAPDH, no podemos valorar si el límite de sensibilidad obtenido en el presente estudio fue mayor o menor. Tampoco podemos determinar si la especificidad de nuestra técnica (cuyo resultado fue siempre negativo en el plasma de voluntario sanos) fue la misma o mayor que la obtenida por Li *et al.*, ya que sus resultados en voluntarios sanos se muestran en el artículo de forma confusa (105).

Es cierto que, dado el bajo número de copias de cfADN diana, la PCR cuantitativa puede dar resultados muy variables (178, 190), y así ha ocurrido en nuestro estudio. Pero esto resulta inevitable en esta técnica, ya que existe un componente de azar en las hibridaciones que han de producirse, cuando se trata de una secuencia en tan escasísima cantidad. Es de esperar que la validación de nuevas técnicas, como la PCR digital, pueda mejorar este aspecto.

En definitiva, en todas las muestras de plasma del presente estudio se pudo detectar GAPDH ARNm (un gen de expresión constitutiva), siendo además positivas todas las réplicas de cada paciente. En un caso no ocurrió así, en una muestra postoperatoria de plasma, y se descartó por error técnico. En las restantes 97 muestras de plasma la detección fue correcta, por lo que podemos deducir que la técnica empleada (incluyendo los *kits* utilizados) fue adecuada y correcta.

5.1.2 Fluorimetría para la detección de ADN total

Los métodos actuales de cuantificación de cfADN, mediante PCR cuantitativa en tiempo real, implican la purificación del ADN con la posterior cuantificación absoluta de secuencias de éste. Se ha intentado buscar técnicas que disminuyan el tiempo necesario para su realización y la necesidad de disponer de un alto volumen de muestra, que estandarizen el proceso o que eviten problemas como el uso de inhibidores en el proceso de extracción, riesgo de contaminación, etc. (47).

Las técnicas de fluorimetría eliminan la compleja fase de extracción, y el ADN es fácilmente medible directamente en las muestras diluidas (191). Con esta técnica se pueden realizar distintos procedimientos para determinar las concentraciones medias de ADN ó ARN presentes en una mezcla, así como su pureza: cuantificación directa y cuantificación indirecta a través de una señal intermedia (generalmente un fluoróforo o una molécula colorimétrica).

Mediante la fluorimetría, los ácidos nucleicos se pueden estudiar valorando la absorbancia ultravioleta de la muestra a 260 nm sobre un espectrofotómetro. Así se pueden cuantificar directamente, convirtiendo la absorbancia en concentración (mediante la ley de Beer-Lambert), o por ensayos de fluorescencia ultravioleta. De este modo la fluorimetría es fácil de preparar y realizar, se obtienen resultados inmediatos, tiene poca variación entre muestras y no se requieren otros reactivos.

Sin embargo esta técnica presenta algunas dificultades: su sensibilidad es limitada, y se requieren microplacas o cubetas transparentes a la luz UV, que pueden ser muy caras. Además la fluorimetría no es muy específica, haciendo que sustancias contenidas en la muestra como nucleótidos, cualquier ADN bacteriano o fúngico, y ADN monocatenario, sean indistinguibles del ADN humano a estudiar, haciendo las cuantificaciones erróneamente elevadas.

En el presente trabajo hemos comprobado la rapidez y facilidad del método, que no nos ha ofrecido problemas técnicos en ninguna de las muestras analizadas.

5.2 Expresión de GAPDH y hTERT para la cuantificación del ARNm

Como ya se ha señalado previamente, la subunidad hTERT es detectable en las células tumorales pero no en la mayoría de las células normales, y se considera determinante en la tasa de expresión de la telomerasa ([105](#)).

En nuestro estudio, en una cohorte de 30 pacientes con cáncer, se analizaron 30 muestras de tejido tumoral y 18 muestras de tejidos adyacentes de aspecto macroscópico normal y distantes más de 2 cm. del tumor. El hecho de que se obtuviera amplificación de hTERT ARNm en todas las muestras de tumor, sugiere que la expresión de hTERT ARNm es una constante en el cáncer de

laringe e hipofaringe. Además se obtuvo amplificación de las 3 réplicas realizadas en 24 muestras (80,0 %).

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores, que también encontraron altos niveles de telomerasa en muestras de tumor procedentes de distintas localizaciones de cabeza y cuello, incluido el cáncer de laringe. Se han descrito porcentajes de positividad del 80% al 87,5% (125, 192, 193). Igualmente, Hohaus *et al.* (1996) estudiando la expresión de telomerasa en 36 muestras de cáncer de laringe, encontraron actividad telomerasa en el 89% de los casos (166) y Luzar *et al.* (2001) detectaron la expresión de hTERT ARNm en el 80% de un grupo de 30 muestras de cáncer de laringe (171). Li *et al.* (2005) en 34 pacientes con cáncer de laringe, detectaron actividad hTERT positiva en el 97,05% de las muestras de tumor (105).

Resultados similares se han obtenido en muestras de tumores malignos procedentes de otros órganos. Buchler *et al.* (2001) detectaron 23,9 veces más actividad hTERT ARNm en el carcinoma de páncreas que en tejidos pancreáticos normales (194). Lehner *et al.* (2002) encontraron en el adenocarcinoma de endometrio niveles de expresión de hTERT ARNm significativamente más altos que en el endometrio (195). Hu *et al.* (2004) analizaron muestras de tejido tumoral gástrico de 35 pacientes y detectaron hTERT ARNm en el 100% de las muestras de tumor (128). Terrin *et al.* (2008) en el cáncer colorectal estudiaron la expresión hTERT ARNm y encontraron una actividad fuertemente positiva en los tumores (196).

Como se ha descrito previamente, del grupo de 30 pacientes intervenidos de cáncer también se obtuvieron 18 muestras de tejidos adyacentes al tumor y con aspecto macroscópico normal aunque sin confirmación histopatológica de normalidad. Se pudo amplificar hTERT ARNm en 13 muestras de las 18 (72,2%).

Estos resultados coinciden en esencia con las publicaciones de otros autores que, en estudios relacionados con el cáncer de cabeza y cuello, han descrito la detección de actividad telomerasa en muestras de tejido no tumoral. Patel *et al.* (1999) en 42 pacientes con sospecha de lesión maligna en el área de cabeza y cuello, detectaron actividad telomerasa en el 100% de las lesiones premalignas y en el 74% de las muestras de tejido histológicamente normal adyacente al tumor (192). También Luzar *et al.* (2001) en 30 muestras de tumor de laringe, detectaron actividad telomerasa en el 33% de los tejidos laríngeos cubiertos por epitelio normal o relativamente hiperplásico en la vecindad del tumor, sugiriendo que podría estar originado en las *stem cells* presentes en el epitelio (171). Resultados parecidos obtuvieron en un estudio sobre 106 muestras de tejido laríngeo (170). Li *et al.* (2005) en 34 pacientes con cáncer de laringe, detectaron actividad hTERT positiva en el 38,23% de las muestras de mucosa normal (105).

La expresión de telomerasa en muestras de tejidos de apariencia normal también ha sido descrita en otros tipos de cáncer, como de cavidad oral (150), esófago (197), colorectal (198), o gástrico (128).

En el caso del cáncer laringe y faringe, se ha sugerido que la exposición crónica a los carcinógenos típicos (tabaco y alcohol fundamentalmente), produciría cambios genéticos y bioquímicos, incluso aunque estas células no sean histopatológicamente malignas. Este proceso de daño tisular en la vía aerodigestiva superior, denominado “cancerificación del campo” (*field cancerification* en la literatura anglosajona) (199) incrementa el riesgo de aparición de múltiples focos premalignos, focos malignos independientes, y a largo plazo tumores metacrónicos. Se considera que la posibilidad de progresión hasta un carcinoma invasivo, desde hiperplasia de células escamosas o de células basales/parabasales, en los siguientes 10 años al diagnóstico es baja (entre 0,9% y 1%). Sin embargo el riesgo aumenta considerablemente en el caso de

hiperplasia atípica (10%), y puede ser máximo (90%) en el carcinoma intraepitelial (172, 200-202).

Algunos autores han sugerido que la presencia de inhibidores de la polimerasa Taq , documentada por Kyo *et al.* (1997) (203), podría explicar una eventual ausencia de detección (192). También existe la posibilidad de que la génesis tumoral se produzca mediante otra vía diferente de la expresión de hTERT, como ya han propuesto algunos autores (105). De hecho, se han reportado tasas relativamente altas de tumores negativos a hTERT ARNm. Por ejemplo Luzar *et al.* (2001) no lo detectaron en el 20% de las muestras de tumor, sugiriendo estos autores que la telomerasa no es esencial para el mantenimiento del fenotipo maligno en todos los carcinomas escamosos de laringe. Comprobaron además que la expresión de hTERT era diferente en distintas zonas del tumor, sugiriendo que en el carcinoma escamoso de laringe podrían existir poblaciones celulares heterogéneas, y posiblemente la expresión hTERT aportaría cierta ventaja a determinados clones celulares (171). Aunque se han descrito mecanismos alternativos para el alargamiento de los telómeros, tales como la recombinación, su papel en la carcinogénesis humana no han sido suficientemente explorado (204). También existe una última posibilidad de subexpresión de hTERT en ciertos estadios de la progresión tumoral.

Como conclusión se puede afirmar que, como ocurre en la mayoría de neoplasias malignas, es posible detectar actividad telomerasa en las muestras de tumor en el cáncer de laringe e hipofaringe, aunque también en un alto porcentaje de muestras de tejidos de la vía aerodigestiva superior, adyacentes al tumor y con aspecto macroscópico normal. Posiblemente las agresiones producidas por los cancerígenos típicos sean responsables de un daño tisular, que puede ser detectado mediante la cuantificación de hTERT ARNm.

A partir de estos resultados, dado que la presencia de carcinoma escamoso en la laringe e hipofaringe se correlacionaba con la sobreexpresión de hTERT ARNm, se investigó la presencia de hTERT en el plasma de los pacientes.

5.3 Utilidad de los ácidos nucleicos circulantes para el diagnóstico y estadificación de los tumores de laringe e hipofaringe

5.3.1 Utilidad de la cuantificación de los genes sobreexpresados en tumores

A pesar del gran número de publicaciones explotando las técnicas basadas en PCR, para encontrar aberraciones de ADN específicas en el suero de pacientes con cáncer, su aplicación clínica permanece oscura. Aunque los resultados han sido prometedores, se ha demostrado que las técnicas basadas en el ADN tienen algunas limitaciones, como su baja sensibilidad debido a la escasez de mutaciones, y su baja especificidad debido a las características comunes compartidas por los diferentes tipos de cáncer y a la complejidad de la detección de las aberraciones genéticas (205, 206).

La actividad telomerasa es el marcador molecular más general para identificar un cáncer humano desde estadios tempranos, y por ello la mayor parte de los autores identifican el hTERT ARNm detectado en plasma como ARN procedente de células tumorales (42, 105). Sin embargo, el hTERT ARNm posee variantes de ensamblaje en los métodos RT-PCR, y algunas de estas variantes se expresan en células que no tienen actividad telomerasa (207). Así, se ha recomendado que en el análisis de la expresión hTERT ARNm se usen cebadores (*primers*) diseñados para distinguir las formas activas de estas variantes de ensamblaje (164).

Respecto al cáncer de laringe e hipofaringe, y de cabeza y cuello en general, aunque la reactivación de la telomerasa ha sido confirmada por varios autores, sugiriendo la utilidad clínica de la detección de hTERT ARNm en plasma (105), su relevancia clínica y pronóstica ha sido variable, posiblemente debido a los diferentes ensayos de telomerasa realizados por cada grupo.

En nuestro estudio, y usando una técnica de RT-PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real, se detectó, y en su caso se cuantificó, el gen hTERT ARNm en el plasma de los pacientes con cáncer. Además se evaluó el gen GAPDH como control interno. Las mismas determinaciones se realizaron en las muestras de plasma del grupo control, sin antecedentes ni enfermedad oncológica conocida.

El análisis estadístico demostró que la frecuencia de detección de hTERT ARNm en la muestra de plasma preoperatoria en los pacientes con cáncer era superior al grupo control de forma significativa ($p=0,01$), por lo que se le puede atribuir valor diagnóstico. Se detectó telomerasa en el 22% pacientes con cáncer.

Otros autores han obtenido resultados similares en la detección de telomerasa en el cáncer de laringe, como Li *et al.* (2005), cuyos resultados cuantitativos mostraron que los niveles de hTERT ARNm estaban significativamente elevados en el plasma de pacientes con cáncer respecto a controles sanos (105).

También ha sido posible detectar hTERT ARNm en el plasma o suero de pacientes con tumores malignos de otra localización. Por ejemplo Chen *et al.* (2000) estudiando 18 pacientes con cáncer de mama, detectaron hTERT ARNm en el 25% de 16 muestras de suero, pero no en controles sanos o en 2 pacientes con patología mamaria benigna (101). Pelosi *et al.* (2006) estudiaron 34 pacientes con cáncer de pulmón y detectaron esta molécula en el 12% de los casos (208). Leelawat *et al.* (2006) estudiaron el suero de 33 pacientes con

colangiocarcinoma, y detectaron hTERT ARNm en 28 (84,8%), pero también en 9 de 41 (21,9%) muestras de suero obtenidas de pacientes con patología benigna del tracto biliar, sugiriendo los autores la contaminación de la muestra por linfocitos (209). Miura *et al.* (2006) analizando el suero de 112 pacientes con distintos tumores pulmonares, encontraron que el número de copias de hTERT ARNm era significativamente más alto en pacientes con cáncer de pulmón que en los controles sanos, sugiriendo que el ARN del suero procedía de tejido tumoral de pulmón (210). Tani *et al.* (2007) estudiaron los niveles en plasma de hTERT ARNm en 52 pacientes intervenidos de carcinoma gástrico, y detectaron esta molécula en el 8% de las muestras de plasma preoperatorias (211). Miura *et al.* (2008) en pacientes con cáncer de pulmón encontraron un número de copias de hTERT ARNm significativamente más alto que en los controles sanos (212). También Miura *et al.* (2008), en 64 pacientes con cáncer hepático, encontraron unos valores de hTERT ARNm más altos que en pacientes con enfermedad hepática crónica (212). Similares resultados obtuvieron Terrin *et al.* (2008) estudiando el plasma de pacientes con cáncer colorectal (196) y Miura *et al.* (2008) en cáncer ginecológico (212). Igualmente Cherneva *et al.* (2010) analizaron la detección de hTERT ARNm en el plasma de 45 pacientes con cáncer no de células pequeñas de pulmón, y encontraron expresión de esta molécula en el 88% de los casos (206).

Como se ha descrito anteriormente, en nuestro estudio para la detección de hTERT ARNm en el plasma de los pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe se obtuvo una sensibilidad de 22,4 %, una especificidad del 100% , con un índice de validez de 49,3%, un valor predictivo positivo de 100 % y un valor predictivo negativo de 40,6%.

Sin embargo, en nuestro trabajo se obtuvieron unos valores de sensibilidad de hTERT ARNm plasmático inferiores a la mayoría de trabajos publicados sobre otros tumores malignos. Por ejemplo Lledó *et al.* (2004) en pacientes con cáncer colorectal encontraron para el hTERT ARNm en plasma

una sensibilidad del 98% y una especificidad del 64% (97). Miura *et al.* en distintos grupos de pacientes con cáncer pulmonar, ginecológico (ovario y útero) y hepático, pudieron detectar hTERT ARNm respecto a los controles sanos, lo que confirió a esta técnica una sensibilidad de entre 74% y 89% y una especificidad entre 70% y 74% (210, 212). March-Villalba *et al.* (2012), lograron una sensibilidad del 85% y una especificidad del 90%, un valor predictivo positivo de 83% y un valor predictivo negativo del 92% para hTERT mRNA en el cáncer de próstata, lo que mejoraba en mucho a la detección con el biomarcador PSA (213). Igualmente Agassi *et al.* (2015), en los estadios iniciales del cáncer de mama hallaron una sensibilidad del 72% y una especificidad del 75% (191).

Como se puede observar, en nuestro trabajo encontramos una sensibilidad para la detección de hTERT en el plasma de los pacientes con cáncer muy inferior respecto a las publicadas por otros autores. Posiblemente esto sea en parte debido a que, en la mayoría de las publicaciones descritas, para calcular la sensibilidad y especificidad de hTERT ARNm se tomó un nivel de corte en las concentraciones de esta sustancia en plasma o suero. En nuestro caso, y dada la gran dispersión obtenida en las concentraciones, para calcular el valor diagnóstico de hTERT ARNm en el plasma no se tomaron las concentraciones plasmáticas absolutas, sino la frecuencia de detección de hTERT ARNm. Las discrepancias encontradas en las distintas publicaciones sobre la estimación de hTERT ARNm también pueden reflejar distintas condiciones biológicas (histología, origen, estadio o tamaño tumoral), técnicas (procesamiento de las muestras, aislamiento de genes), o tamaño de las muestras de pacientes.

En nuestro trabajo no se encontró relación estadísticamente significativa entre la detección de hTERT ARNm en el plasma de los pacientes con cáncer y la presencia de neoplasia maligna previa, el grado T y N, o la aparición de un segundo tumor maligno en el periodo de seguimiento. Sin embargo la detección

de hTERT ARNm en plasma preoperatorio fue significativamente más frecuente en los tumores supraglóticos que en los glóticos ($p = 0,02$).

También se estudió la relación entre la concentración de hTERT ARNm en las muestras preoperatorias de plasma [preQ-hTERT] y los parámetros anatomoclínicos. El análisis estadístico no encontró relación entre la [preQ-hTERT] y los antecedentes de neoplasia maligna previa, grado tumoral T y N, o la aparición de un segundo tumor en el periodo de seguimiento. Por el contrario se encontraron niveles más elevados en el caso de tumores supraglóticos, con un relación estadística próxima a la significación (0,055). Por tanto, podemos decir que la detección de hTERT ARNm en el plasma de los pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe puede servir como herramienta clínica complementaria para el diagnóstico del proceso canceroso, pero no para su estadificación.

Esta ausencia de correlación entre los niveles de hTERT y parámetros anatomoclínicos en el cáncer de cabeza y cuello, ya ha sido descrita por otros autores. En su trabajo Li *et al.* (2005) no encontraron correlación significativa entre la sobreexpresión de hTERT ARNm en plasma y parámetros patológicos como el grado tumoral T ó N (105).

Similar ausencia de correlación también ha sido descrita en otros tumores malignos. Lledó *et al.* (2004) en 50 pacientes intervenidos de cáncer colorectal no encontraron relación significativa entre los niveles séricos de hTERT y parámetros anatomoclínicos como sexo, edad, estadio o presencia de metástasis (97). Tampoco Leelawat *et al.* (2006), en su trabajo sobre el colangiocarcinoma, encontraron relación entre estos niveles en suero y tamaño tumoral, estadio o presencia de metástasis en ganglios linfáticos, concluyendo que no predicen el pronóstico de este tumor (209). Igualmente Tani *et al.* (2007), en el cáncer gástrico, tampoco encontraron asociación significativa entre la determinación de actividad telomerasa y varios factores clínicopatológicos como edad, sexo,

tamaño tumoral, tipo histológico, profundidad de invasión, metástasis linfática o estadio tumoral (211).

Sin embargo en otras publicaciones sí se encuentra una relación significativa entre los niveles de hTERT y distintos parámetros anatomoclínicos. Miura *et al.* (2006), en el cáncer de pulmón, encontraron una relación significativa entre el número de copias de hTERT ARNm obtenidas en el suero, y hábito tabáquico, tamaño tumoral, y número de tumores (210). Igualmente, en el cáncer hepático, Miura *et al.* (2008) encontraron que la expresión de hTERT ARNm se relacionaba con parámetros como tamaño y número tumoral y grado de diferenciación (212), y en el cáncer de pulmón encontraron que la expresión de hTERT en el suero preoperatorio estaba significativamente asociada a tabaquismo y tamaño tumoral (212). Terrin *et al.* (2008) en pacientes con cáncer colorectal, encontraron que los niveles de hTERT ARNm fueron significativamente más bajos en pacientes con estadios I y II que con estadios III y IV (196). Miura *et al.* (2008) estudiaron 176 pacientes con distintas patologías ginecológicas, que incluían 47 con cáncer de ovario y 63 con cáncer uterino, y el número de copias de hTERT ARNm se correlacionó significativamente con el estadio tumoral (212). March-Villalba *et al.* (2012) en el cáncer de próstata demostraron que el hTERT ARNm en plasma discrimina entre enfermedad localizada y localmente avanzada, se relaciona con el estadio tumoral, invasión vascular y perineural (213).

En el presente estudio, en los pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe se encontró relación estadísticamente significativa entre la detección de hTERT ARNm en la muestra de plasma preoperatoria y el desarrollo posterior de recidiva local y/o regional ($p=0,02$), y aunque no se encontró relación con el desarrollo de metástasis a distancia, esta estaba próxima a la significación estadística ($p= 0,06$). Por otro lado se encontró relación estadísticamente significativa entre la [preQ-hTERT] y el desarrollo posterior de recidiva local y/o regional ($p= 0,046$), y de metástasis a distancia ($p=0,047$).

También en otros tumores se ha descrito esta relación con indicadores de mal pronóstico. Hiyama *et al.* (1995) en el neuroblastoma metastásico encontraron peor pronóstico en aquellos pacientes con más altos niveles de telomerasa (153). Miura *et al.* (2006), en el cáncer de pulmón, encontraron una relación significativa entre el número de copias de hTERT ARNm obtenidas en el suero, y presencia o ausencia de metástasis y recidivas (210), y Miura *et al.* (2008) en el cáncer de pulmón encontraron que la expresión de hTERT en el suero preoperatorio estaba significativamente asociada a la presencia de metástasis y recurrencia (212). March-Villalba *et al.* (2012) en el cáncer de próstata demostraron que el hTERT ARNm en plasma es un predictor de recurrencia (213).

Resultados similares se han obtenido estudiando la detección de otros tipos de ARNm tumoral. Por ejemplo Honma *et al.* (2006) encontraron que la detección de ARNm del antígeno de células escamosas (SCC-Ag ARNm) mediante PCR era el mejor factor predictivo de recurrencia en pacientes con cáncer de esófago (214).

De nuestro trabajo se puede concluir que el hTERT ARNm puede ser detectado y cuantificado en el plasma de los pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe y considerarse una herramienta útil en el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad.

5.3.2 Utilidad de la cuantificación de la expresión de los genes constitutivos

La RT-PCR se ha convertido en un medio popular de valoración del nivel de expresión del ARNm, debido a su relativa sencillez técnica, sensibilidad, precisión y capacidad de amplificar la señal de ARNm. Sin embargo, como ha apuntado Bustin (2002), la facilidad y rapidez con la que se adquieren los datos en esta técnica, pueden crear fácilmente una falsa sensación de objetividad (215).

La cantidad de ARNm obtenido puede fluctuar, debido a factores como diferencias en la masa tisular, número de células obtenidas, tratamiento experimental de diferente eficiencia en la preparación del ARN o variaciones en los lotes de reactivos de PCR.

Con el fin de estimar las diferencias en el contenido de un ARNm específico en las muestras es necesaria la medición simultánea de genes constitutivos, que valoran las diferencias de expresión de ARNm muestra a muestra, la calidad del ARN y la eficiencia de la transcriptasa inversa, amplificando el gen constitutivo como control. Para cada curva estándar se obtienen el número de copias del gen constitutivo y del gen diana respectivamente. En principio, la relación entre el número de copias de uno y otro representa el valor normalizado para cada muestra, y puede ser comparado con el de otras muestras ([105](#), [128](#), [216-218](#)).

Los genes constitutivos o de referencia se llaman así porque su síntesis se produce en todos los tipos celulares nucleados, ya que son necesarios para la supervivencia celular ([186](#)). Son por tanto esenciales en los mecanismos regulatorios endógenos, y están implicados en procesos tan diversos como metabolismo, homeostasis, estructura celular o transcripción génica ([219](#)). Diferentes genes constitutivos se han usado como referencia, incluyendo histona 3.3, β -actina, β 2-microglobulina, ciclooxigenasa 1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), ARN ribosomal 18S, *abl*, *bcr*, aldolasa, hipoxantina fosforibosil transferasa, porfobilinógeno deaminasa (PBGD), dihidrofolato reductasa (DHFR) o el receptor de transferrina ([216](#), [218](#), [220](#)). Dos de los genes más utilizados en los análisis de ácidos nucleicos son la GAPDH y β -actina.

La elección de un gen de referencia apropiado es fundamental para los análisis cuantitativos de la expresión de ARNm en la técnica de RT-PCR. Las primeras comparaciones de los niveles de expresión génica se basaban en el supuesto de que los genes constitutivos se expresarían de forma constante en

todos los tejidos de los organismos multicelulares y bajo diferentes condiciones experimentales (186, 218). Sin embargo diferentes estudios han demostrado invariablemente que sus niveles de expresión difieren dramáticamente entre tejidos (216), o en relación con variaciones en el tratamiento experimental (221-226). Esto puede ser en parte explicado porque los genes constitutivos no sólo están implicados en el metabolismo basal celular, sino en otras funciones (186).

La GAPDH es uno de los diez enzimas que participan en la glicolisis, y es clave en este proceso celular, catalizando la conversión de gliceraldehído-3-fosfato en 1,3- bifosfoglicerato usando el NAD^+ como cofactor y fosfato inorgánico (227, 228). Bajo condiciones normales la GAPDH existe predominantemente como un homotetrámero, una conformación requerida para su actividad catalítica (229). La GAPDH está codificada por un único gen en el cromosoma humano XII, que da lugar a una única especie de ARNm sin variantes de ensamblaje conocidas (229). El ARNm que codifica la GAPDH se expresa universalmente (217).

El GAPDH ARNm se ha usado frecuentemente como mera referencia y marcador citosólico para el análisis de otras moléculas (proteínas, ácidos nucleicos) y procesos considerados más interesantes (229). Sin embargo, tras diferentes publicaciones en los últimos años, la GAPDH está emergiendo como un componente clave en la función y regulación de muchos procesos celulares, independientes de su papel productor de energía en la glicolisis (228-230).

Es conocido que los niveles de expresión génica de GAPDH pueden variar en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo el estrés oxidativo y la hipoxia, que pueden causar una sobreexpresión de GAPDH (231-234). Así, en condiciones normales la GAPDH se encuentra predominantemente en el citoplasma, pero en respuesta al estrés puede experimentar una traslocación al núcleo celular. En el núcleo, la GAPDH es un componente clave para la división celular. Uniéndose a los ácidos nucleicos, la GAPDH está implicada en la

mediación de la exportación de ARN nuclear, protegiendo al ARNm de la degradación, a través de la interacción con los elementos ricos en AU, y en la reparación del ADN (229, 235). Se ha demostrado que diferentes tipos de ARN interactúan con la GAPDH tanto *in vitro* como en células intactas (236, 237). También se ha comprobado que la GAPDH se une directamente a los telómeros, y que protege a las células de un acortamiento telomérico desencadenado por el tratamiento con quimioterapia (238, 239). Igualmente los agentes depleccionadores de GAPDH pueden tener un efecto citostático en las células cancerosas (240). Estos hallazgos sugieren que la GAPDH también regula la estabilidad cromosómica, incluyendo el mantenimiento de la homeostasis del telómero para facilitar la longevidad de la proliferación celular (229). Así, los niveles de GAPDH se encuentran típicamente elevados en células transformadas y células tumorales malignas (241, 242), lo que se relaciona, al menos en parte, con la elevada actividad glicolítica y proliferación celular característica de las neoplasias (243). Además es conocido que muchos tumores desarrollan un estado de hipoxia debido a sus altos requerimientos energéticos y vascularización desorganizada, lo que podría provocar la sobreexpresión de GAPDH (229).

Por otro lado se ha demostrado que la GAPDH induce la senescencia de las células cancerosas con inhibición significativa de la actividad telomerasa y acortamiento de la longitud de los telómeros (229). Así, se ha identificado un incremento de la expresión de GAPDH en células neuronales inmediatamente antes de su muerte celular programada (244-246). Además las células que experimentan apoptosis muestran elevados niveles de GAPDH en el núcleo (247, 248). En definitiva la GAPDH puede regular, de forma positiva y negativa, la supervivencia y proliferación celulares (229).

Diferentes autores han utilizado el GAPDH ARNm como control interno en la cuantificación de ARNm y ADN en distintos tipos de cáncer (103, 249). Zainuddin *et al.* (2010) indicaron que el nivel de expresión de GAPDH era estable con concentraciones totales de ARN en el rango 50-100 ng/μl (217).

Además, es frecuente en los distintos estudios sobre expresión génica que los resultados cuantitativos de ARNm se expresen de forma normalizada, es decir como una *ratio* del ARNm objeto de estudio respecto al GAPDH ARNm. Sin embargo, algunos autores han considerado que la GAPDH puede ser inapropiada como referencia interna debido a su variabilidad (215, 250). De hecho, existen diferencias significativas en los niveles de expresión de GAPDH ARNm entre los diferentes tejidos: por ejemplo se han encontrado niveles altos en corazón y cerebro, y relativamente bajos en otros órganos como el páncreas (216, 251, 252), en relación con distintas demandas energéticas. Por tanto la expresión de genes constitutivos sólo sería constante para determinados tipos celulares y en condiciones experimentales precisas, y podría no ser útil para aplicaciones rutinarias en laboratorio (186). Además la demostración de concentraciones elevadas de GAPDH ARNm en pacientes con cáncer, tanto asociado como no asociado a partículas, indica la precaución a la hora de interpretar los valores de ARNm como una *ratio*. Por ello, algunos autores han sugerido que la normalización de los test de expresión génica de ARNm respecto a GAPDH como control interno, deben referirse a cada tipo de tejido en particular (216), y que hasta que se determine definitivamente el papel del ARNm, asociado o no partículas, se debe ser prudente al expresar las medidas de ARNm, expresándolo mejor como concentraciones absolutas (103). Una alternativa sería realizar la normalización sobre el ARN total. Esta actitud, que evitaría las controversias y la validación de los genes constitutivos, sin embargo no controla el error introducido por la retrotranscripción y otros pasos en la RT-PCR y además requiere cantidades significativas de ARN (250). De todo lo anterior se deduce que, como apuntan algunos autores, el problema de la normalización en las determinaciones de ARNm está todavía sin resolver (253).

En el presente estudio la detección de GAPDH ARNm plasmático confirmó la correcta extracción y retrotranscripción, pero se descartó utilizar sus niveles para normalizar los de hTERT ARNm, ya que no hubo correlación alguna entre ambos.

Los niveles plasmáticos de GAPDH ARNm se analizaron por tanto de forma independiente, y se encontró que en los pacientes fue muy superior que en voluntarios sanos ($p = 0,001$).

Diferentes publicaciones han descrito niveles elevados de GAPDH ARNm, tanto en muestras de tumor, como de carcinoma hepatocelular (254, 255), riñon (256), pulmón (257), mama (258) o próstata (259), como en el plasma de pacientes con cáncer hepático (103).

Pero, los niveles de GAPDH ARNm en nuestro estudio, no se mostraron útiles para la estadificación tumoral ni para establecer el pronóstico. No se encontró relación estadísticamente significativa entre la [preQ- GAPDH] y el antecedente de neoplasia maligna previa, grados T y N, situación del tumor dentro de la vía aerodigestiva superior, o la aparición de recidiva local y/o regional, metástasis a distancia, o una segunda neoplasia maligna en el periodo de seguimiento.

De todo lo anterior se puede concluir que, hasta que no se dilucide de forma precisa la distribución en el plasma de las especies de ARNm, en forma asociada o no asociada a partículas, se debe tener precaución a la hora de interpretar los resultados analíticos, expresándolos mejor como concentraciones absolutas en vez de concentraciones normalizadas. Respecto al GAPDH ARNm, este no debe considerarse un mero control interno en el estudio de la expresión de otros genes, y aunque todavía está por determinar su papel último en la oncogénesis y su relación con otros marcadores tumorales tales como hTERT ARNm, en el cáncer de laringe e hipofaringe puede tener un valor diagnóstico complementario.

5.3.3 Utilidad de la cuantificación de ADN total

Muchos laboratorios han evaluado y comparado diferentes métodos de extracción para aislamiento de cfADN en plasma, y han demostrado que la extracción puede diferir considerablemente en términos de eficiencia, dependiendo del método (182, 260-267). El cfADN es una molécula difícil de analizar debido su baja concentración en el plasma en sujetos normales (en rango de 1,8-44 ng/ml), aunque puede estar considerablemente incrementada en situaciones como el embarazo o en pacientes con patologías diversas (≥ 100 ng/ml) (39, 58). Aunque el cfADN está fragmentado por naturaleza y está presente en individuos normales, puede diferir en el perfil del tamaño de los fragmentos, dependiendo del proceso celular causante de su liberación en la circulación (74, 268). Además, aunque es generalmente aceptado que la mayoría de las variaciones observadas entre diferentes individuos tienen un origen biológico, hay muchas consideraciones técnicas que pueden causar un amplio rango de discrepancias en las mediciones (178). Las extracciones son comúnmente realizadas sobre 1 ml de plasma (264, 266), aunque últimamente se están comercializando *kits* para partir de volúmenes mayores (3 ml). Se ha reportado que la cantidad esperada de cfADN en el plasma de un sujeto normal está en el orden 1,000 genoma equivalentes por mm³ de sangre. Sin embargo no sólo este valor varía considerablemente en la literatura, sino que la unidad usada para reportar los valores varía (unidades de absorción, ng/ ml de plasma, etc...) y el método para convertir una unidad en otra (por ejemplo conversión de ng/ml en genoma equivalentes/ml) está basada en ciertos supuestos, como la representación genómica uniforme en una muestra, y considerando 3,3 pg como el peso de un genoma haploide humano (178). Además es de notar que los *loci* situados en una localización más telomérica (hTERT y GAPDH), son más abundantes que aquellos en una posición más centromérica (178).

Históricamente, muchos de los métodos de extracción usados en los estudios de cfADN, tales como los *kits* “Quiamp DNA Blood Mini” y el “QIAmp Virus” (ambos de Qiagen), fueron desarrollados inicialmente para extraer ácidos nucleicos de alta integridad genómica a partir de células sanguíneas o viriones, y no para cfADN muy fragmentados. Esto podría ser responsable de la ineficiencia de algunos métodos de extracción (178). Sin embargo, esta idea tampoco está libre de controversia, ya que se ha reportado que el cfADN tiene mayor integridad (269), aunque otros estudios apuntan en sentido contrario (270, 271). Se ha reportado que la concentración media de cfADN en plasma en pacientes con tumores sólidos es de 17 ng/ml (rango 0,5 – 1600), que es 3 veces más alta que en sujetos sanos (272).

En nuestro estudio se cuantificaron, mediante fluorimetría, los niveles de ADN en el plasma de 19 pacientes con cáncer (17 con cáncer de laringe y 2 con cáncer de hipofaringe) sin extracción previa, alcanzando valores medios del orden de 50 µg/ml.

Coulet *et al.* (2000) estudiaron las concentraciones de ADN en el plasma de 117 pacientes con cáncer de cabeza y cuello, mediante fluorimetría y detección de inestabilidad de microsatélites y mutación p53, y en la gran mayoría de los casos (n= 76) las concentraciones fueron <100 ng/ml, mientras que un número menor de pacientes (n= 41) tuvieron concentraciones >100 ng/ml (107). En nuestro trabajo los valores medios fueron muy superiores, lo que posiblemente esté relacionado con la técnica utilizada.

En nuestro estudio se intentó correlacionar los niveles de ADN plasmático con los datos anatomoclínicos y pronósticos. No se encontró relación significativa con el antecedente de neoplasia maligna previa, grados T y N, la situación del tumor dentro de la vía aerodigestiva superior, y aparición de recidiva local y/o regional, o metástasis a distancia en la evolución de la enfermedad.

Otros autores tampoco encontraron relación significativa entre los niveles de ADN en plasma y datos anatomoclínicos en el cáncer de cabeza y cuello. Coulet *et al.* (2000) no encontraron relación entre el sexo, estadio tumoral, localización del tumor y los niveles plasmáticos de ADN, aunque más del 50% de los pacientes correspondían a estadios avanzados (III y IV) (107). Otros autores han encontrado niveles elevados tanto en estadios tempranos como avanzados de la enfermedad, con ausencia de correlación con otros parámetros clínicos significativos, y sin significación pronóstica (110).

Similares resultados se han obtenido en otros tipos de cáncer. Tampoco Sozzi *et al.* (2001) encontraron alguna correlación entre los niveles de cfADN y el diagnóstico o pronóstico en el cáncer de pulmón (84).

Sin embargo algunos trabajos han reportado una relación entre los niveles de ADN y ciertos parámetros anatomoclínicos. Nawroz *et al.* (1996) analizaron la presencia de cfADN tumoral en una pequeña muestra de 21 pacientes con cáncer de cabeza y cuello, e indicaron que estaba significativamente correlacionado con tumores más avanzados (273). León *et al.* (1977) mediante radioinmunoensayo encontraron niveles de ADN más elevados en el suero de pacientes con algunos tipos de cáncer como de cabeza y cuello, pulmón, mama, ovario, útero o liposarcoma. Además los pacientes con niveles más altos (>100 ng/ml) tenían enfermedad metastática. Asimismo, los pacientes con tumores localizados y de crecimiento lento tendían a tener unos niveles más bajos que aquellos con tumores de crecimiento más rápido y pobremente diferenciados (35). También en otros tipos de tumores malignos se ha reportado relación entre los niveles de ADN plasmático y el estadio tumoral, como en el cáncer de pulmón, en el que pacientes con enfermedad más avanzada tenían niveles significativamente más altos (274), en el cáncer gástrico (275) o en el de mama (191). No obstante, las conclusiones siguen siendo discordantes entre autores.

Se puede concluir de nuestro estudio que la cuantificación de ADN en el plasma, mediante un método extremadamente sencillo como la fluorimetría, no resultó de utilidad clínica en la estadificación y el pronóstico en el cáncer de laringe e hipofaringe. Al no haberse realizado la cuantificación de los niveles de ADN en el plasma del grupo control, no se pudo valorar su valor diagnóstico. Por otra parte, dado el pequeño tamaño de la muestra, tampoco se puede descartar una potencial relación entre los niveles de ADN y los datos anatomoclínicos o pronósticos. Serían necesarios estudios más amplios sobre este aspecto.

5.4 Efecto de la cirugía de los tumores laringofaríngeos sobre los niveles de ácidos nucleicos plasmáticos

Existen pocos trabajos publicados sobre el efecto de la cirugía en los niveles plasmáticos de ácidos nucleicos. Teóricamente estos niveles podrían estar influidos por distintos factores: la manipulación de los tejidos tumorales durante la intervención quirúrgica, con la subsecuente liberación de ácidos nucleicos al torrente circulatorio, la disminución de CNA en relación con exéresis del tumor o la curación de la enfermedad, o el posible mantenimiento de su detección en relación con la persistencia, recidiva o metástasis.

Además, se ha postulado que distintos factores que concurren en los procedimientos quirúrgicos, como el clampaje vascular, que produce hipoxia y estrés celular, o las drogas anestésicas empleadas, podrían afectar a la composición molecular de las muestras tisulares y así la fiabilidad de los resultados en los análisis realizados. Otro factor potencial a considerar sería el tiempo transcurrido entre la resección del tumor y el procesamiento de las muestras (276, 277).

Así, se han detectado cambios significativos en los patrones de expresión de genes y proteínas algunos minutos después de la extirpación quirúrgica tumoral. Spruessel *et al.* (2004), en muestras de cáncer de colon, comprobaron que entre el 10-15% de todos los genes modificaban su expresión en los 15 minutos siguientes a la colectomía (276). También en estudios adicionales, en el cáncer de colon, se han observado distintos patrones de alteración en la expresión génica y de proteínas que ocurre tras la isquemia ocurrida en la toma de muestras tisulares (278), por lo que se ha recomendado el uso en los estudios experimentales de muestras con las mismas condiciones de obtención y procesamiento (276, 279). De la misma forma, se ha demostrado que la diseminación hematógena tras la exéresis quirúrgica del tumor primario parecía estar más relacionada con la liberación de ADN extracelular que con la de células tumorales (83).

5.4.1 Efecto de la cirugía sobre los niveles plasmáticos de genes sobreexpresados en tumores

Consideramos, para valorar los resultados obtenidos en nuestro estudio, el momento de la extracción de la muestra de plasma postoperatoria, diferenciando entre el periodo postoperatorio medio (entre 28 y 49 días) y el tardío (entre 58 y 223 días) (Fig. 30), pues este podría tener influencia decisiva en la frecuencia de detección y cuantificación de los CNA. Sin embargo, la cirugía no modificó los niveles de hTERT. Además, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los niveles obtenidos en el postoperatorio medio (28 – 49 días) y el tardío (58-223 días).

En el cáncer de laringe e hipofaringe, y de cabeza y cuello en general, existen escasos trabajos que comparen la modificación en los niveles de ácidos nucleicos circulantes tras el tratamiento quirúrgico. Li *et al* (2005) en 34 pacientes intervenidos de cáncer de laringe, encontraron una disminución

significativa de los niveles de hTERT ARNm plasmático 2 días tras la exéresis quirúrgica de un tumor laríngeo (105).

Respecto a otros tipos de cáncer, tampoco existen numerosas publicaciones respecto a la modificación de los niveles de hTERT ARNm en relación con la terapia oncológica. Wong *et al.* (2004) observaron tras la cirugía una disminución de los niveles ARNm de β -catenina en el plasma, en 16 de 19 pacientes con cáncer colorectal (280). Igualmente, Miura *et al.* (2006), en el cáncer de pulmón, comprobaron un descenso de los niveles séricos de hTERT ARNm un mes tras el tratamiento quirúrgico. Los valores de hTERT ARNm no se correlacionaron de forma significativa con los valores de EGFR ARNm. En 2 pacientes los niveles de EGFR ARNm estaban elevados un mes después de la cirugía, comparados con los niveles previos a la cirugía, sugiriendo la diseminación de las células cancerosas (210). En el trabajo de Tani *et al.* (2007) sobre cáncer gástrico, en el seguimiento postoperatorio de 12 pacientes detectaron hTERT en el plasma sólo en 2 pacientes, lo que se relacionó con recidiva tumoral (211). Miura *et al.* (2008) en pacientes con cáncer ginecológico, no encontraron relación entre las muestras antes y durante el tratamiento, y el hTERT ARNm disminuyó significativamente después de la terapia (212). Pucciarelli *et al.* (2012), estudiando el cáncer rectal, cuantificaron los niveles plasmáticos de cfARN y hTERT ARNm y si estos se asociaban con la respuesta tumoral, en pacientes tratados con quimiorradioterapia preoperatoria. Encontraron que las diferencias entre los niveles de hTERT mRNA y ARN libre circulante de las muestras post- y pre-tratamiento, y los niveles de hTERT y ARN post-tratamiento eran predictores de respuesta. Bajos niveles de ARN pre-tratamiento, bajos niveles de ARN post-tratamiento y una drástica disminución en los niveles de ARN post-tratamiento fueron también indicadores de respuesta tumoral. Concluyeron que las variaciones de ARN y hTERT ARNm en el plasma reflejaron significativamente la respuesta tumoral a la quimiorradioterapia preoperatoriamente, y que los niveles disminuyeron significativamente en los pacientes con respuesta al tratamiento, mientras que se mantuvieron inalterados e

incluso aumentaron en aquellos casos sin respuesta a la terapia. Estos autores sugirieron que las diferencias en los niveles plasmáticos de ARN y hTERT ARNm entre los pacientes que no respondieron a la radioquimioterapia preoperatoria y aquellos pacientes con buena respuesta, podría deberse a que en el primer grupo los tumores serían mayores y necrosis más activa. Se consideró interesante que la monitorización de los niveles durante y después del tratamiento podría ofrecer una información más relevante que una única determinación (281).

5.4.2 Efecto de la cirugía sobre los niveles plasmáticos de genes constitutivos

En la cohorte de pacientes en los que se analizó el GAPDH ARNm en el primer periodo postoperatorio (28-49 días), se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los niveles pre- y postoperatorios, por lo que la cirugía no modificó dichos niveles. Tampoco hubo diferencia estadísticamente significativa entre los niveles obtenidos en el postoperatorio temprano y tardío. Sin embargo, seleccionando sólo aquellos pacientes en los que se realizó cordectomía laser (n=9), el incremento de estos niveles en el postoperatorio, sí fue estadísticamente significativo.

Revisando la bibliografía no se han encontrado estudios específicos sobre la modificación de los niveles de GAPDH en plasma en relación con la intervención quirúrgica.

Sería de esperar, como se ha publicado en algunos trabajos con los genes sobreexpresados en tumores, que los niveles de GAPDH se hubiesen modificado en relación con el tratamiento quirúrgico, pero no fue así. Aunque la cirugía láser no es un procedimiento especialmente agresivo, pues se usa habitualmente en tumores localizados, posiblemente el daño térmico producido en los tejidos y el prolongado periodo de cicatrización podría explicar el incremento de los

niveles de GAPDH ARNm ocurrido en el postoperatorio que sí ocurrió en este caso.

5.4.3 Efecto de la cirugía sobre los niveles de ADN total

En nuestro trabajo, en los pacientes con cáncer no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de ADN en la muestra preoperatoria y los de la postoperatoria. En general los niveles encontrados en el postoperatorio fueron superiores a los del preoperatorio, pero esta diferencia sólo fue significativa cuando se compararon las concentraciones en plasma de la muestra preoperatoria con aquellas muestras extraídas en el postoperatorio tardío (entre 58 y 223 días) ($p=0,02$;) (tabla IX).

Sin embargo otros autores sí han encontrado una disminución de los niveles de cfADN tras completar un tratamiento oncológico. Se ha sugerido como explicación a este hecho una disminución en la tasa de liberación de ADN o una rápida degradación (84). Así, León *et al.* (1977) observaron que en algunos tumores (pulmón, ovario, útero, cérvix y linfoma) la mayoría de los pacientes (66-90%) respondían a la radioterapia con una disminución en los niveles de ADN, mientras que los tumores de otra localización (mama, colon, recto, glioma) este efecto se encontraba en un número menor de pacientes (16-33%) (35).

También otros autores han obtenido resultados similares. Sozzi *et al.* (2001), en el seguimiento de los pacientes con cáncer de pulmón, encontraron una disminución progresiva en los niveles de ADN circulante 1-6 meses tras la intervención quirúrgica, alcanzando los de los sujetos sanos (84). Frattini *et al.* (2006), tras la intervención quirúrgica del carcinoma colorectal, encontraron una disminución progresiva de los niveles de ADN en el plasma de los pacientes libres de enfermedad (282). Igualmente, Catarino *et al.* (2008), en el cáncer de mama, encontraron una disminución en los niveles de ADN en plasma tras la intervención quirúrgica (283). Szpechcinsky *et al.* (2012), en 53 pacientes

intervenidos de carcinoma no de células pequeñas de pulmón, encontraron un aumento de los niveles de ADN una semana tras la intervención quirúrgica. En aquellos pacientes con buena respuesta al tratamiento se encontró una disminución de los niveles durante un periodo postoperatorio de 3-6 meses (284). Agassi *et al.* (2015), encontraron niveles más altos en los pacientes previamente a la intervención quirúrgica respecto al grupo control. El grupo postquirúrgico tenían un nivel normal, que no era diferente del grupo control, y más bajo que el grupo prequirúrgico (191).

Diversas publicaciones han atribuido a los niveles de cfADN postoperatorios un significado pronóstico. En general, el mantenimiento o elevación de estos se ha relacionado con persistencia o recidiva de la enfermedad. Igualmente, la persistencia de *KRAS* mutado circulante se ha relacionado con la recurrencia o progresión de la enfermedad (285-287). León *et al.* (1977) observaron, cuando el tratamiento era benéfico, con disminución del tamaño tumoral y reducción del dolor, una disminución en los niveles de ADN sérico (35). En el cáncer de pulmón, Sozzi *et al.* (2001) observaron que el incremento de los niveles de ADN se relacionó con recidiva, metástasis o aparición de un segundo tumor (84). También Frattini *et al.* (2006), tras la intervención quirúrgica del carcinoma colorectal, encontraron un incremento de ADN en el plasma en aquellos casos con recidiva o metástasis (282), y Szpechcinsky *et al.* (2012), en el cáncer de pulmón relacionaron la recidiva con niveles de ADN significativamente más altos (284).

La ausencia de modificaciones en los niveles de ADN tras el tratamiento quirúrgico obtenidos en nuestro trabajo, posiblemente se relacione con el pequeño tamaño de la muestra de pacientes con cáncer, y sobre todo, con la técnica empleada. No obstante no se pueden establecer conclusiones en tanto no se realicen estudios con un tamaño de muestra mayor, y que comparen la fluorimetría sin extracción previa con otras técnicas.

5.5 Valor pronóstico de los ácidos nucleicos libres plasmáticos en el cáncer de laringe e hipofaringe

5.5.1 Valor pronóstico de la cuantificación de los genes sobreexpresados en tumores

En nuestro estudio, debido a la gran dispersión de los resultados en la cuantificación de los niveles de hTERT ARNm en plasma, y para estudiar la relación entre esta molécula y la supervivencia de los pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe, se consideró más interesante la frecuencia de detección (sí/no) de esta molécula en las muestras de plasma que los niveles absolutos. Esta observación coincide con la de otros autores como Clark *et al.* (1997) quienes estudiando muestras de tumor de pacientes con cáncer de mama, describieron que la relación entre los niveles de actividad telomerasa y el curso clínico de la enfermedad es continua más que discreta, pues no se ha identificado un punto de corte obvio que identifique pacientes con una evolución clínica particularmente buena o mala. En general, parece que una vez la telomerasa se ha activado, el nivel de actividad telomerasa sería un indicador del número de células tumorales telomerasa-positivas dentro del tumor, siendo más interesante dividir a la población en grupos telomerasa positivos o negativos (288).

Aunque en nuestro trabajo se encontró una relación estadísticamente significativa entre la detección de hTERT ARNm en la muestra de plasma preoperatoria y el desarrollo posterior de recidiva local y/o regional ($p = 0,02$), y la relación con las metástasis a distancia estaba próxima a la significación estadística ($p = 0,06$), no se encontró relación entre la detección de hTERT ARNm en la muestra de plasma preoperatoria y la supervivencia de los pacientes con cáncer.

Por el contrario, independientemente del momento de la extracción de la muestra de plasma postoperatoria, sí se encontró relación estadísticamente significativa entre la detección postoperatoria de hTERT ARNm plasmático y una menor supervivencia ($p = 0,04$). Igualmente también se encontró menor supervivencia en los pacientes en que se había detectado hTERT en el periodo postoperatorio tardío (entre 58 y 223 días) ($p = 0,002$), pero no en aquellos pacientes en los que la segunda muestra se había obtenido en el periodo postoperatorio medio (entre 28 y 49 días).

Varios autores han encontrado una correlación entre la expresión de telomerasa en muestras de tumor y el pronóstico del cáncer. Hiyama *et al.* (1995) reportaron que los pacientes con neuroblastoma metastásico cuyas muestras de tumor tenían niveles elevados de telomerasa tenían peor pronóstico que aquellos telomerasa negativos (153). También en el cáncer gástrico se ha comprobado una supervivencia menor en los pacientes en cuyas muestras fue detectada esta actividad (289). Clark *et al.* (1997) en muestras de tumor de pacientes con cáncer de mama con afectación de ganglios linfáticos, encontraron que los niveles de actividad telomerasa, cuando se ajustaban a la celularidad tumoral, se correlacionaban con la supervivencia (288). También Marchetti *et al.* (1999) demostraron que, en el estadio I del cáncer no de células pequeñas de pulmón, la actividad telomerasa en las muestras de tumor se relacionaba con el supervivencia de los pacientes (290). Tatsumoto *et al.* (2000), en el cáncer colorectal encontraron peor pronóstico en los pacientes cuyas muestras de tumor expresaban alta actividad de telomerasa (291).

Patel *et al.* (2002) estudiaron la actividad telomerasa y la longitud de los telómeros mediante PCR y TRF (*Terminal restriction fragment Souther blot analysis*) en 110 muestras de tumor, y 40 muestras de tejido sano o lesiones precancerosas de cabeza y cuello. El análisis estadístico demostró que la activación de la telomerasa en las muestras de tumor y la longitud de los telómeros en tejido adyacente normal no tenía efecto sobre el intervalo libre de

enfermedad de los pacientes a los 2 años. Sin embargo el curso clínico de la enfermedad se correlacionó significativamente con el estado de la activación de telomerasa en el tejido adyacente normal y también con la longitud de los telómeros en las muestras de tumor. Se observó una mayor supervivencia libre de enfermedad a los 2 años en los pacientes que no mostraron telomerasa en los tejidos adyacentes normales, comparados con los que mostraron activación de la telomerasa, mientras que pacientes con valores TRF por debajo de la media en las muestras del tumor mostraron significativamente peor pronóstico, comparados con los que tenían valores de TRF por encima de la media (292).

Respecto a la detección de hTERT en plasma, diversas publicaciones también han relacionado los niveles de hTERT ARNm en plasma con el pronóstico de los pacientes con cáncer. Por ejemplo Sirera *et al.* (2011), en el cáncer no de células pequeñas de pulmón, encontraron que los niveles preoperatorios de hTERT en plasma son un factor independiente en relación con la supervivencia (293). Mach-Villalba *et al.* (2012), en el cáncer de próstata, observaron que los pacientes con niveles más elevados de hTERT en plasma tenían una menor supervivencia libre de enfermedad (213). Kang *et al.*, (2013), en el cáncer gástrico, describieron una correlación significativa entre los niveles elevados de hTERT ARNm y una disminución de la supervivencia global y libre de enfermedad (294).

Actualmente, en la práctica clínica diaria, el estudio histopatológico del tumor índice resecado y el estado de los ganglios linfáticos cervicales son los principales factores empleados para indicar un tratamiento adyuvante con radioterapia y/o quimioterapia tras la cirugía por un carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Sin embargo también los tumores en estadios iniciales también pueden recidivar. Es por lo que la detección postoperatoria de hTERT ARNm en el plasma de los pacientes intervenidos de cáncer de laringe o hipofaringe podría ser útil como marcador indicador de peor pronóstico y de indicación de terapias adyuvantes postoperatorias, además de un seguimiento más estrecho.

Por otro lado, el establecimiento de protocolos de preservación de órgano en el cáncer avanzado de laringe e hipofaringe, constituye para el clínico una preocupación permanente. El uso de radioterapia y quimioterapia concomitantes, conlleva a menudo dificultades en el seguimiento de la enfermedad. La detección y cuantificación de ARN de telomerasa en plasma, podría ser muy útil en el diagnóstico de una posible persistencia o recidiva tumoral tras un tratamiento combinado, situaciones en las que las actuales técnicas de exploración y diagnóstico por imagen no siempre son resolutivas.

Aunque la traslación de los hallazgos de los estudios moleculares a la práctica clínica es fuente continua de debate, debido a la dificultad de comparar y normalizar los datos de los diferentes estudios, se puede concluir de nuestro trabajo que la detección de hTERT ARNm en el plasma tiene cierto valor pronóstico en el cáncer de laringe e hipofaringe, y puede ser usada en la monitorización de esta enfermedad como herramienta complementaria.

5.5.2 Valor pronóstico de la cuantificación de la expresión de los genes constitutivos

En el presente estudio, no se encontró relación entre las concentraciones de GAPDH en las muestras de plasma preoperatorias o postoperatorias y el pronóstico de los pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe.

Como se ha señalado previamente, diversos estudios indican que la GAPDH está involucrada en la apoptosis, y se han encontrado niveles altos de expresión de GAPDH en diferentes tumores comparados con el tejido normal (189, 256-258, 295). La sobreexpresión de GAPDH se correlaciona con mal pronóstico o agresividad en cáncer de ovario, mama, renal, colorectal y melanoma (295).

De los resultados de nuestro estudio se puede considerar que, aunque el análisis de GAPDH ARNm en el plasma no tiene valor pronóstico, puede tener valor complementario en el estudio de los pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe.

5.5.3 Valor pronóstico de la cuantificación de ADN total en plasma

En nuestro estudio no se pudo obtener un valor pronóstico de la cuantificación de ADN en plasma en los pacientes con cáncer, ni en el momento del diagnóstico ni en el seguimiento, aunque los niveles de ADN plasmático en el postoperatorio temprano tuvieron una relación con el desarrollo posterior de recidiva y de metástasis cercana a la significación estadística ($p= 0,056$ en ambos casos).

Otros autores han descrito resultados similares. Por ejemplo, Sozzi *et al.* (2001), no encontraron relación entre los niveles de ADN circulante y pronóstico en el cáncer de pulmón (84).

Sin embargo otras publicaciones demuestran que altos niveles de cfADN en la enfermedad maligna avanzada se relacionan con el pronóstico (87, 187). Lecomte *et al.* (2002) encontraron asociación entre la detección de ADN tumoral (mediante detección de mutaciones *KRAS*, e hipermetilación p16) antes del tratamiento y un pronóstico pobre en el cáncer colorectal (296). Es también interesante, en un estudio prospectivo Gormally *et al.* (2004), que siguieron más de 500.000 sujetos sanos, que la presencia de niveles elevados de cfADN en plasma significó un factor de riesgo para el desarrollo futuro de leucemia (297). Gautschi *et al.* (2004) estudiando pacientes con cáncer no de células pequeñas de pulmón, demostraron que altos niveles plasmáticos de cfADN tanto basales como después de un tratamiento con quimioterapia, tenían valor pronóstico para predecir una supervivencia menor (274). Czeiger *et al.* (2011) en un estudio 38 pacientes con cáncer colorectal, analizaron en el suero los niveles de cfADN

mediante fluorimetría. Niveles prequirúrgicos elevados de antígeno carcinoembrionario (CEA) y ADN se relacionaron con muerte o enfermedad neoplásica 1 año tras la resección (298).

Una aproximación para entender los CNA es la identificación de pacientes en principio con buen pronóstico pero con mala evolución. En el cáncer de mama se ha comprobado que las pacientes en estadios iniciales pero con ADN tumoral circulante tienen una supervivencia menor (299).

Sin embargo otros autores han sugerido que un incremento en los niveles de cfADN en plasma, suero o cualquier otro fluido no es específico de ninguna enfermedad, de modo que los análisis cuantitativos tienen un papel limitado como biomarcador, aunque en asociación con otros parámetros clínicos y/o marcadores cualitativos moleculares podrían ser útiles en la valoración de la respuesta a la terapia (39).

De todo lo anterior se puede concluir que los niveles de cfADN pueden ser útiles en la monitorización de la enfermedad neoplásica, y no descartamos que, con una muestra mayor que en nuestro estudio, se podrían obtener en el cáncer de laringe e hipofaringe resultados similares a los obtenidos en otros tipos de tumor.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La expresión de hTERT ARNm, al igual que ocurre en otros tumores malignos, está significativamente incrementada en el cáncer de laringe e hipofaringe, ya que es posible detectar esta molécula en todos los casos, no así en el tejido adyacente de la vía aerodigestiva superior.

2. En el plasma de los pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe fue posible detectar hTERT ARNm. No así en los voluntarios sanos, por lo que esta detección tiene valor diagnóstico.

3. La detección de hTERT en el plasma en el postoperatorio del cáncer de laringe e hipofaringe tiene valor pronóstico, ya que se relaciona con el desarrollo posterior de recidiva, metástasis y menor supervivencia.

4. Los niveles de GAPDH ARNm en el plasma, en esta enfermedad, fueron muy superiores a los del grupo de voluntarios sanos, aunque en nuestro estudio no se mostraron útiles para la estadificación tumoral ni para establecer el pronóstico.

5. La RT- PCR puede considerarse un método sencillo y eficaz para detectar y cuantificar ARNm tumoral plasmático en el cáncer de laringe e hipofaringe. La cuantificación de ADN en plasma por fluorimetría no aportó ningún valor diagnóstico ni pronóstico.

6. La detección de hTERT ARNm libre en plasma podría potencialmente usarse como “biopsia líquida” en el cáncer de laringe e hipofaringe, para monitorización de la enfermedad, y/o detección de alteraciones genómicas producidas como resultado de resistencias a la terapia.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Auperin A, Hill C. [Epidemiology of head and neck carcinomas]. *Cancer Radiother.* 2005 Feb;9(1):1-7.
2. Braakhuis BJ, Leemans CR, Visser O. Incidence and survival trends of head and neck squamous cell carcinoma in the Netherlands between 1989 and 2011. *Oral Oncol.* 2014 Jul;50(7):670-5.
3. Karatzanis AD, Psychogios G, Waldfahrer F, Kapsreiter M, Zenk J, Velegrakis GA, et al. Management of locally advanced laryngeal cancer. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;43(1):4.
4. Jaworowska E, Serrano-Fernandez P, Tarnowska C, Lubinski J, Kram A, Masojc B, et al. Clinical and epidemiological features of familial laryngeal cancer in Poland. *Cancer Detect Prev.* 2007;31(4):270-5.
5. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008 Jan 1;122(1):155-64.
6. Islami F, Tramacere I, Rota M, Bagnardi V, Fedirko V, Scotti L, et al. Alcohol drinking and laryngeal cancer: overall and dose-risk relation--a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2010 Nov;46(11):802-10.
7. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Feb;18(2):541-50.
8. de Souza DL, Perez MM, Curado MP. Gender differences in the incidence of laryngeal and hypopharyngeal cancers in Spain. *Cancer Epidemiol.* 2011 Aug;35(4):328-33.
9. Lefebvre J.L. CD. *Cancers du larynx. Oto-rhino-laryngologie: EMC (Elsevier SAS, Paris);* 2005.
10. Bosetti C, Garavello W, Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in laryngeal cancer mortality in Europe. *Int J Cancer.* 2006 Aug 1;119(3):673-81.
11. Meisel P. Cancer, genes and gender. *Carcinogenesis.* 2002 Jun;23(6):1087-8; author reply 9.
12. Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G, et al. Cancer of the larynx. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003 Jul;47(1):65-80.
13. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013 Apr;49(6):1374-403.
14. Forman D. BF, Brewster D.H., Gombe Mbalawa C., Kohler B., Piñeros M., Steliarova-Foucher E., Swaminathan R., Ferlay J. *Cancer Incidence in Five Continents*2013; X.
15. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014 Jan;15(1):23-34.
16. Karim-Kos HE, de Vries E, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JW. Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *Eur J Cancer.* 2008 Jul;44(10):1345-89.
17. Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer.* 2005 May 1;114(5):806-16.
18. Coupland VH, Chapman P, Linklater KM, Sehgal A, Moller H, Davies EA. Trends in the epidemiology of larynx and lung cancer in south-east England, 1985-2004. *Br J Cancer.* 2009 Jan 13;100(1):167-9.

19. Eleftheriadou A, Chalastras T, Ferekidou E, Kyriou L, Yiotakis I, Pappas Z, et al. Clinical effectiveness of tumor markers in squamous cell carcinoma of the larynx. *Anticancer Res.* 2006 May-Jun;26(3B):2493-7.
20. Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KS, Simpson J, El Mofty S, et al. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope.* 2001 Jun;111(6):1079-87.
21. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med.* 2003 Nov 27;349(22):2091-8.
22. Kambic V GN. *Epithelial hyperplastic lesions of the larynx.* : Elsevier; 1995 Amsterdam.
23. Wan XC, Egloff AM, Johnson J. Histological assessment of cervical lymph node identifies patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): who would benefit from chemoradiation after surgery? *Laryngoscope.* 2012 Dec;122(12):2712-22.
24. Rowley H. The molecular genetics of head and neck cancer. *J Laryngol Otol.* 1998 Jul;112(7):607-12.
25. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.* 1993;7(3):139-46.
26. Putti TC, To KF, Hsu HC, Chan AT, Lai GM, Tse G, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancers correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. *Histopathology.* 2002 Aug;41(2):144-51.
27. Bentzen SM, Atasoy BM, Daley FM, Dische S, Richman PI, Saunders MI, et al. Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 2005 Aug 20;23(24):5560-7.
28. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2001 Dec 27;345(26):1890-900.
29. Gonzalez-Masia JA, Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *Onco Targets Ther.* 2013;6:819-32.
30. Li Y, Elashoff D, Oh M, Sinha U, St John MA, Zhou X, et al. Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. *J Clin Oncol.* 2006 Apr 10;24(11):1754-60.
31. Kim KY, McShane LM, Conley BA. Designing biomarker studies for head and neck cancer. *Head Neck.* 2014 Jul;36(7):1069-75.
32. Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck.* 2006 Mar;28(3):256-69.
33. Mandel P MP. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris.* 1948;142.
34. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1966 Nov;45(11):1732-40.
35. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977 Mar;37(3):646-50.
36. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989;46(5):318-22.
37. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994 Jan-Feb;3(1):67-71.

38. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994 Apr;86(4):774-9.
39. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jan;1775(1):181-232.
40. Johnson PJ, Lo YM. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem.* 2002 Aug;48(8):1186-93.
41. Kopreski MS, Benko FA, Borys DJ, Khan A, McGarrity TJ, Gocke CD. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jun 7;92(11):918-23.
42. Dasi F, Lledo S, Garcia-Granero E, Ripoll R, Marugan M, Tormo M, et al. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest.* 2001 May;81(5):767-9.
43. Silva JM, Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Sanchez A, Rodriguez O, et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res.* 2001 Sep;7(9):2821-5.
44. Silva JM, Silva J, Sanchez A, Garcia JM, Dominguez G, Provencio M, et al. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clin Cancer Res.* 2002 Dec;8(12):3761-6.
45. van der Vaart M, Pretorius PJ. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Aug;1137:18-26.
46. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011 Jun;11(6):426-37.
47. Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, Michal M, et al. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLoS One.* 2014;9(3):e87838.
48. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Muller MM. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem.* 2004 Sep;50(9):1668-70.
49. Atamaniuk J, Vidotto C, Kinzlbauer M, Bachl N, Tiran B, Tschan H. Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2010 Nov;110(4):695-701.
50. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Niess AM, Simon P. Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clin Chem.* 2011 Apr;57(4):633-6.
51. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker--a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta.* 2010 Nov 11;411(21-22):1611-24.
52. Yu M. Somatic mitochondrial DNA mutations in human cancers. *Adv Clin Chem.* 2012;57:99-138.
53. Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology.* 2007 Apr;39(2):197-207.
54. Giovannetti E, Erozeñci A, Smit J, Danesi R, Peters GJ. Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012 Feb;81(2):103-22.
55. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest.* 1973 Jan;52(1):198-204.
56. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res.* 1975 Sep;35(9):2375-82.
57. Harbeck RJ, Hoffmann AA, Carr RI. Studies on the nature of circulating DNA in systemic lupus erythematosus (SLE). *J Rheumatol.* 1975 Jun;2(2):194-203.

58. Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* 2007 Mar 6;581(5):795-9.
59. Li CN, Hsu HL, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA is released from tumor cells upon cell death: a study of tissue cultures of tumor cell lines. *J Clin Lab Anal.* 2003;17(4):103-7.
60. Choi JJ, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology.* 2005 May;115(1):55-62.
61. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1659-65.
62. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res.* 2007 May-Jun;635(2-3):105-17.
63. Samos J, Garcia-Olmo DC, Picazo MG, Rubio-Vitaller A, Garcia-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma/serum and tumor progression: are apoptotic bodies involved? An experimental study in a rat cancer model. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Sep;1075:165-73.
64. Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Aug;1137:7-17.
65. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Apr;906:161-8.
66. Thijssen MA, Swinkels DW, Ruers TJ, de Kok JB. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases. *Anticancer Res.* 2002 Jan-Feb;22(1A):421-5.
67. Ilie M, Hofman V, Long E, Bordone O, Selva E, Washetine K, et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med.* 2014 Nov;2(11):107.
68. Garcia-Olmo DC, Gutierrez-Gonzalez L, Ruiz-Piqueras R, Picazo MG, Garcia-Olmo D. Detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma during tumor progression in rats. *Cancer Lett.* 2005 Jan 10;217(1):115-23.
69. Garcia-Olmo DC, Samos J, Picazo MG, Asensio AI, Toboso I, Garcia-Olmo D. Release of cell-free DNA into the bloodstream leads to high levels of non-tumor plasma DNA during tumor progression in rats. *Cancer Lett.* 2008 Dec 8;272(1):133-40.
70. Garcia-Olmo DC, Picazo MG, Toboso I, Asensio AI, Garcia-Olmo D. Quantitation of cell-free DNA and RNA in plasma during tumor progression in rats. *Mol Cancer.* 2013;12:8.
71. Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem.* 2001 Aug;47(8):1488-9.
72. Frost PG, Lachmann PJ. The relationship of desoxyribonuclease inhibitor levels in human sera to the occurrence of antinuclear antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1968 Jun;3(5):447-55.
73. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 8;102(45):16368-73.
74. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas.* 1998 Jul;17(1):89-97.
75. Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta.* 2008 Jan;387(1-2):55-8.

76. Holdenrieder S, Stieber P, Chan LY, Geiger S, Kremer A, Nagel D, et al. Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem*. 2005 Aug;51(8):1544-6.
77. Chen Z, Fadiel A, Naftolin F, Eichenbaum KD, Xia Y. Circulation DNA: biological implications for cancer metastasis and immunology. *Med Hypotheses*. 2005;65(5):956-61.
78. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomestasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Sep;945:265-75.
79. Garcia-Olmo DC, Dominguez C, Garcia-Arranz M, Anker P, Stroun M, Garcia-Verdugo JM, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res*. 2010 Jan 15;70(2):560-7.
80. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2013 Mar 28;368(13):1199-209.
81. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015 Jun 24;7(293):293ra104.
82. Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, qi Chen X, Anker P, Alstead EM, et al. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*. 1998 Feb;4(2):271-5.
83. Garcia-Olmo DC, Gutierrez-Gonzalez L, Samos J, Picazo MG, Atienzar M, Garcia-Olmo D. Surgery and hematogenous dissemination: comparison between the detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma before and after tumor resection in rats. *Ann Surg Oncol*. 2006 Aug;13(8):1136-44.
84. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4675-8.
85. Gal S, Fidler C, Lo YM, Taylor M, Han C, Moore J, et al. Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *Br J Cancer*. 2004 Mar 22;90(6):1211-5.
86. Ren N, Ye QH, Qin LX, Zhang BH, Liu YK, Tang ZY. Circulating DNA level is negatively associated with the long-term survival of hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol*. 2006 Jun 28;12(24):3911-4.
87. Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, Chale JJ, Pourrat JP, Pujazon MC, et al. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett*. 1995 May 8;91(2):221-7.
88. Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Nguyen M. p53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001 Aug;7(8):2222-7.
89. Guadalajara H, Dominguez-Berzosa C, Garcia-Arranz M, Herreros MD, Pascual I, Sanz-Baro R, et al. The concentration of deoxyribonucleic acid in plasma from 73 patients with colorectal cancer and apparent clinical correlations. *Cancer Detect Prev*. 2008;32(1):39-44.
90. Herrera LJ, Raja S, Gooding WE, El-Hefnawy T, Kelly L, Luketich JD, et al. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. *Clin Chem*. 2005 Jan;51(1):113-8.
91. Hibi K, Robinson CR, Booker S, Wu L, Hamilton SR, Sidransky D, et al. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res*. 1998 Apr 1;58(7):1405-7.
92. Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Sep;945:1-7.
93. Wieczorek AJ, Rhyner C, Block LH. Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 May;82(10):3455-9.

94. Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 1999 Aug;5(8):1961-5.
95. Lo KW, Lo YM, Leung SF, Tsang YS, Chan LY, Johnson PJ, et al. Analysis of cell-free Epstein-Barr virus associated RNA in the plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Chem.* 1999 Aug;45(8 Pt 1):1292-4.
96. Silva JM, Rodriguez R, Garcia JM, Munoz C, Silva J, Dominguez G, et al. Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells. *Gut.* 2002 Apr;50(4):530-4.
97. Lledo SM, Garcia-Granero E, Dasi F, Ripoli R, Garcia SA, Cervantes A, et al. Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2004 Jul;6(4):236-42.
98. Dasi F, Martinez-Rodes P, March JA, Santamaria J, Martinez-Javaloyas JM, Gil M, et al. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in the plasma of patients with prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Sep;1075:204-10.
99. Kopreski MS, Benko FA, Gocke CD. Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Sep;945:172-8.
100. Chinnappa P, Taguba L, Arciaga R, Faiman C, Siperstein A, Mehta AE, et al. Detection of thyrotropin-receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease: sensitive and specific markers for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Aug;89(8):3705-9.
101. Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):3823-6.
102. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem.* 2002 Oct;48(10):1647-53.
103. Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, et al. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem.* 2002 Aug;48(8):1212-7.
104. Wong BC, Chan KC, Chan AT, Leung SF, Chan LY, Chow KC, et al. Reduced plasma RNA integrity in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 15;12(8):2512-6.
105. Li YR, Wu JM, Wang L, Huang X, Shi J, Hu LH. Human telomerase reverse transcriptase expression and its clinical significance in laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2005 Apr;125(4):409-14.
106. Capkova M, Sachova J, Strnad H, Kolar M, Hroudova M, Chovanec M, et al. Microarray analysis of serum mRNA in patients with head and neck squamous cell carcinoma at whole-genome scale. *Biomed Res Int.* 2014;2014:408683.
107. Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, Lecomte T, Lacourreye O, Brasnu D, et al. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res.* 2000 Feb 1;60(3):707-11.
108. Silva JM, Bonilla F. Correspondence re: F. Coulet et al., Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res.*, 60: 707-709, 2000. *Cancer Res.* 2001 Dec 1;61(23):8595-6.
109. Nawroz-Danish H, Eisenberger CF, Yoo GH, Wu L, Koch W, Black C, et al. Microsatellite analysis of serum DNA in patients with head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2004 Aug 10;111(1):96-100.
110. Nunes DN, Kowalski LP, Simpson AJ. Circulating tumor-derived DNA may permit the early diagnosis of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2001 Apr 15;92(2):214-9.
111. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Sep;85(18):6622-6.
112. Greider CW. Telomeres. *Curr Opin Cell Biol.* 1991 Jun;3(3):444-51.

113. Mabruk MJ, O'Flatharta C. Telomerase: is it the future diagnostic and prognostic tool in human cancer? *Expert Rev Mol Diagn.* 2005 Nov;5(6):907-16.
114. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990 May 31;345(6274):458-60.
115. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature.* 1991 Apr 18;350(6319):569-73.
116. Ripoll R. Cuantificación en tiempo real de la subunidad HTER (telomerase reverse transcriptase) del gen de la telomerasa en plasma de pacientes con cáncer colorectal. Valencia: Universitat de Valencia; 2007.
117. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* 1985 Dec;43(2 Pt 1):405-13.
118. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell.* 1989 Nov 3;59(3):521-9.
119. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. *Science.* 1995 Sep 1;269(5228):1236-41.
120. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):785-95.
121. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science.* 1997 Aug 15;277(5328):955-9.
122. Dez C, Henras A, Faucon B, Lafontaine D, Caizergues-Ferrer M, Henry Y. Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. *Nucleic Acids Res.* 2001 Feb 1;29(3):598-603.
123. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature.* 1999 Dec 2;402(6761):551-5.
124. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res.* 1991 Mar-Nov;256(2-6):271-82.
125. Curran AJ, Gullane PJ, Irish J, Macmillan C, Freeman J, Kamel-Reid S. Telomerase activity is upregulated in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope.* 2000 Mar;110(3 Pt 1):391-6.
126. Rambhatla L, Chiu CP, Glickman RD, Rowe-Rendleman C. In vitro differentiation capacity of telomerase immortalized human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 May;43(5):1622-30.
127. Condon J, Yin S, Mayhew B, Word RA, Wright WE, Shay JW, et al. Telomerase immortalization of human myometrial cells. *Biol Reprod.* 2002 Aug;67(2):506-14.
128. Hu LH, Chen FH, Li YR, Wang L. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2004 Dec 1;10(23):3514-7.
129. Snijders PJ, van Duin M, Walboomers JM, Steenbergen RD, Risse EK, Helmerhorst TJ, et al. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res.* 1998 Sep 1;58(17):3812-8.
130. Kirkpatrick KL, Clark G, Ghilchick M, Newbold RF, Mokbel K. hTERT mRNA expression correlates with telomerase activity in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2003 May;29(4):321-6.
131. Liu K, Schoonmaker MM, Levine BL, June CH, Hodes RJ, Weng NP. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 27;96(9):5147-52.

132. Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett.* 2003 May 15;194(2):221-33.
133. Ali AS, Chopra R, Robertson J, Testa NG. Detection of hTERT protein by flow cytometry. *Leukemia.* 2000 Dec;14(12):2176-81.
134. Xu D, Gruber A, Peterson C, Pisa P. Telomerase activity and the expression of telomerase components in acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1998 Sep;102(5):1367-75.
135. Jong HS, Park YI, Kim S, Sohn JH, Kang SH, Song SH, et al. Up-regulation of human telomerase catalytic subunit during gastric carcinogenesis. *Cancer.* 1999 Aug 15;86(4):559-65.
136. Toshikuni N, Nouse K, Higashi T, Nakatsukasa H, Onishi T, Kaneyoshi T, et al. Expression of telomerase-associated protein 1 and telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2000 Feb;82(4):833-7.
137. Kanaya T, Kyo S, Takakura M, Ito H, Namiki M, Inoue M. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 1998 Nov 23;78(5):539-43.
138. Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M, Inoue M. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer.* 1999 Jan 5;80(1):60-3.
139. Park TW, Riethdorf S, Riethdorf L, Loning T, Janicke F. Differential telomerase activity, expression of the telomerase catalytic sub-unit and telomerase-RNA in ovarian tumors. *Int J Cancer.* 1999 Aug 20;84(4):426-31.
140. Reynolds CP, Zuo JJ, Kim NW, Wang H, Lukens JN, Matthay KK, et al. Telomerase expression in primary neuroblastomas. *Eur J Cancer.* 1997 Oct;33(12):1929-31.
141. de Kok JB, Ruers TJ, van Muijen GN, van Bokhoven A, Willems HL, Swinkels DW. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues. *Clin Chem.* 2000 Mar;46(3):313-8.
142. de Kok JB, Zendman AJ, van de Locht LT, Ruers TJ, van Muijen GN, Mensink EJ, et al. Real-time hTERT quantification: a promising telomerase-associated tumor marker. *Lab Invest.* 1999 Jul;79(7):911-2.
143. Eissa S, Kenawy G, Moteleb FA, El-Makhzangyc AN, Nassar M. Real-time PCR hTERT mRNA pattern in tumor core, edge, resection margin, and lymph nodes in laryngeal tumors: relation to proliferative index and impact on prognosis. *Clin Biochem.* 2005 Oct;38(10):873-8.
144. Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, et al. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene.* 1998 Mar 5;16(9):1217-22.
145. Sharma ND, Balasubramanian S, Khanna N, Bahadur S, Chattopadhyay TK, Singh N. Telomerase activity in Indian patients with carcinomas of the aerodigestive tract. *Tumour Biol.* 1999 Jul-Aug;20(4):225-32.
146. Liao J, Mitsuyasu T, Yamane K, Ohishi M. Telomerase activity in oral and maxillofacial tumors. *Oral Oncol.* 2000 Jul;36(4):347-52.
147. Miyoshi Y, Tsukinoki K, Imaizumi T, Yamada Y, Ishizaki T, Watanabe Y, et al. Telomerase activity in oral cancer. *Oral Oncol.* 1999 May;35(3):283-9.
148. Califano J, Ahrendt SA, Meiningner G, Westra WH, Koch WM, Sidransky D. Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res.* 1996 Dec 15;56(24):5720-2.
149. Zhang S, Dong M, Teng X, Chen T. Quantitative assay of telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and other tissues. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001 May;127(5):581-5.
150. Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, Mathew B, Nalinakumari KR, Nair MK, et al. Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997 Jun;6(6):413-20.

151. Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res.* 1997 Feb 15;57(4):610-4.
152. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 12;91(8):2900-4.
153. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med.* 1995 Mar;1(3):249-55.
154. Paradis V, Dargere D, Laurendeau I, Benoit G, Vidaud M, Jardin A, et al. Expression of the RNA component of human telomerase (hTR) in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and normal prostate tissue. *J Pathol.* 1999 Oct;189(2):213-8.
155. Bachand F, Kukolj G, Autexier C. Expression of hTERT and hTR in cis reconstitutes and active human telomerase ribonucleoprotein. *RNA.* 2000 May;6(5):778-84.
156. Wu A, Ichihashi M, Ueda M. Correlation of the expression of human telomerase subunits with telomerase activity in normal skin and skin tumors. *Cancer.* 1999 Nov 15;86(10):2038-44.
157. Nakayama J, Tahara H, Tahara E, Saito M, Ito K, Nakamura H, et al. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet.* 1998 Jan;18(1):65-8.
158. Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma or serum. *Clin Chim Acta.* 2001 Nov;313(1-2):143-6.
159. De Kok JB, Schalken JA, Aalders TW, Ruers TJ, Willems HL, Swinkels DW. Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in urothelial cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2000 Jul 15;87(2):217-20.
160. Blasco MA, Rizen M, Greider CW, Hanahan D. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nat Genet.* 1996 Feb;12(2):200-4.
161. Soder AI, Hoare SF, Muir S, Going JJ, Parkinson EK, Keith WN. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene.* 1997 Mar 6;14(9):1013-21.
162. Kanamaru T, Tanaka K, Kotani J, Ueno K, Yamamoto M, Idei Y, et al. Telomerase activity and hTERT mRNA in development and progression of adenoma to colorectal cancer. *Int J Mol Med.* 2002 Aug;10(2):205-10.
163. Hisatomi H, Nagao K, Kanamaru T, Endo H, Tomimatsu M, Hikiji K. Levels of telomerase catalytic subunit mRNA as a predictor of potential malignancy. *Int J Oncol.* 1999 Apr;14(4):727-32.
164. Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene.* 2002 Jan 21;21(4):643-9.
165. Koscielny S, Fiedler W, Dahse R, Beleites E. [Reactivation of telomerase in squamous epithelial carcinomas in the area of the head and neck]. *Laryngorhinootologie.* 2000 Sep;79(9):551-6.
166. Hohaus S, Cavallo S, Bellacosa A, Genuardi M, Galli J, Cadoni G, et al. Telomerase activity in human laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1996 Nov;2(11):1895-900.
167. Thurnher D, Knerer B, Formanek M, Kornfehl J. Non-radioactive semiquantitative testing for the expression levels of telomerase activity in head and neck squamous cell carcinomas may be indicative for biological tumour behaviour. *Acta Otolaryngol.* 1998 Jun;118(3):423-7.
168. Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, Lee JS, Lippman SM, Kayser S, et al. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res.* 1996 Dec 15;56(24):5600-4.
169. Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol.* 1999 Jul;180(1):10-8.

170. Luzar B, Poljak M, Marin IJ, Gale N. Telomerase reactivation is an early event in laryngeal carcinogenesis. *Mod Pathol*. 2003 Sep;16(9):841-8.
171. Luzar B, Poljak M, Marin IJ, Fischinger J, Gale N. Quantitative measurement of telomerase catalytic subunit (hTERT) mRNA in laryngeal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res*. 2001 Nov-Dec;21(6A):4011-5.
172. Luzar B, Poljak M, Gale N. Telomerase catalytic subunit in laryngeal carcinogenesis--an immunohistochemical study. *Mod Pathol*. 2005 Mar;18(3):406-11.
173. Curran AJ, St Denis K, Irish J, Gullane PJ, MacMillan C, Kamel-Reid S. Telomerase activity in oral squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Jul;124(7):784-8.
174. Edge SB BD, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. , editor. *AJCC cancer staging manual* 7th. ed. New York: Springer; 2010.
175. Reddi KK, Holland JF. Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Jul;73(7):2308-10.
176. Chiu RW, Poon LL, Lau TK, Leung TN, Wong EM, Lo YM. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem*. 2001 Sep;47(9):1607-13.
177. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem*. 2003 Jun;49(6 Pt 1):1028-9.
178. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem*. 2014 Oct;406(26):6499-512.
179. Pinzani P, Salvianti F, Pazzagli M, Orlando C. Circulating nucleic acids in cancer and pregnancy. *Methods*. 2010 Apr;50(4):302-7.
180. Pinzani P, Salvianti F, Orlando C, Pazzagli M. Circulating cell-free DNA in cancer. *Methods Mol Biol*. 2014;1160:133-45.
181. Vallee A, Marcq M, Bizieux A, Kouri CE, Lacroix H, Bennouna J, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer*. 2013 Nov;82(2):373-4.
182. Xue X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta*. 2009 Jun 27;404(2):100-4.
183. Barrett AN, Zimmermann BG, Wang D, Holloway A, Chitty LS. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS One*. 2011;6(10):e25202.
184. Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, Mueller R, DeSantis G, van den Boom D, et al. Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem*. 2013 Aug;46(12):1099-104.
185. Hidestrand M, Stokowski R, Song K, Oliphant A, Deavers J, Goetsch M, et al. Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther*. 2012;31(2):122-8.
186. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*. 1999 Oct 8;75(2-3):291-5.
187. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*. 1983 Jun 1;51(11):2116-20.
188. Tsao SC, Weiss J, Hudson C, Christophi C, Cebon J, Behren A, et al. Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. *Sci Rep*. 2015;5:11198.
189. Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2002 Nov 1;95(9):1938-45.

190. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech.* 2004 Sep;15(3):155-66.
191. Agassi R, Czeiger D, Shaked G, Avriel A, Sheynin J, Lavrenkov K, et al. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a simple fluorescent test in patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2015 Jan;143(1):18-24.
192. Patel MM, Patel DD, Parekh LJ, Raval GN, Rawal RM, Bhatavdekar JM, et al. Evaluation of telomerase activation in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 1999 Sep;35(5):510-5.
193. Mutirangura A, Supiyaphun P, Trirekapan S, Sriuranpong V, Sakuntabhai A, Yenrudi S, et al. Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996 Aug 1;56(15):3530-3.
194. Buchler P, Conejo-Garcia JR, Lehmann G, Muller M, Emrich T, Reber HA, et al. Real-time quantitative PCR of telomerase mRNA is useful for the differentiation of benign and malignant pancreatic disorders. *Pancreas.* 2001 May;22(4):331-40.
195. Lehner R, Enomoto T, McGregor JA, Shroyer AL, Haugen BR, Pugazhenth U, et al. Quantitative analysis of telomerase hTERT mRNA and telomerase activity in endometrioid adenocarcinoma and in normal endometrium. *Gynecol Oncol.* 2002 Jan;84(1):120-5.
196. Terrin L, Rampazzo E, Pucciarelli S, Agostini M, Bertorelle R, Esposito G, et al. Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 15;14(22):7444-51.
197. Takubo K, Nakamura K, Izumiyama N, Mafune K, Tanaka Y, Miyashita M, et al. Telomerase activity in esophageal carcinoma. *J Surg Oncol.* 1997 Oct;66(2):88-92.
198. Cheng AJ, Tang R, Wang JY, See LC, Wang TC. Possible role of telomerase activation in the cancer predisposition of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Feb 18;90(4):316-21.
199. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953 Sep;6(5):963-8.
200. Hellquist H, Cardesa A, Gale N, Kambic V, Michaels L. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. *Histopathology.* 1999 Mar;34(3):226-33.
201. Kamvic V. Hyperplastic lesions of the larynx. Amsterdam: Elsevier; 1995.
202. Gale N, Kambic V, Michaels L, Cardesa A, Hellquist H, Zidar N, et al. The Ljubljana classification: a practical strategy for the diagnosis of laryngeal precancerous lesions. *Adv Anat Pathol.* 2000 Jul;7(4):240-51.
203. Kyo S, Kunimi K, Uchibayashi T, Namiki M, Inoue M. Telomerase activity in human urothelial tumors. *Am J Clin Pathol.* 1997 May;107(5):555-60.
204. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet.* 2000 Dec;26(4):447-50.
205. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Mar;2(3):210-9.
206. Cherneva R, Georgiev O, Dimova I, Rukova B, Petrov D, Toncheva D. EGFR and hTERT Expression as a Diagnostic Approach for Non-small Cell Lung Cancer in High Risk Groups. *Biomark Cancer.* 2010;2:57-63.
207. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.* 1998 Sep 15;58(18):4168-72.
208. Pelosi G, Schianchi E, Dell'orto P, Veronesi G, Spaggiari L, Pasini F, et al. Detecting cell-free circulating hTERT mRNA in the plasma may identify a subset of nonsmall cell lung cancer patients. *Virchows Arch.* 2006 Jan;448(1):7-15.

209. Leelawat K, Leelawat S, Ratanachu-Ek T, Trubwongchareon S, Wannaprasert J, Tripongkaruna S, et al. Circulating hTERT mRNA as a tumor marker in cholangiocarcinoma patients. *World J Gastroenterol*. 2006 Jul 14;12(26):4195-8.
210. Miura N, Nakamura H, Sato R, Tsukamoto T, Harada T, Takahashi S, et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Sci*. 2006 Dec;97(12):1366-73.
211. Tani N, Ichikawa D, Ikoma D, Tomita H, Sai S, Ikoma H, et al. Circulating cell-free mRNA in plasma as a tumor marker for patients with primary and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res*. 2007 Mar-Apr;27(2):1207-12.
212. Miura N, Hasegawa J, Shiota G. Serum messenger RNA as a biomarker and its clinical usefulness in malignancies. *Clin Med Oncol*. 2008;2:511-27.
213. March-Villalba JA, Martinez-Jabaloyas JM, Herrero MJ, Santamaria J, Alino SF, Dasi F. Cell-free circulating plasma hTERT mRNA is a useful marker for prostate cancer diagnosis and is associated with poor prognosis tumor characteristics. *PLoS One*. 2012;7(8):e43470.
214. Honma H, Kanda T, Ito H, Wakai T, Nakagawa S, Ohashi M, et al. Squamous cell carcinoma-antigen messenger RNA level in peripheral blood predicts recurrence after resection in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery*. 2006 May;139(5):678-85.
215. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002 Aug;29(1):23-39.
216. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005 May 11;21(3):389-95.
217. Zainuddin A, Chua KH, Abdul Rahim N, Makpol S. Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts. *BMC Mol Biol*. 2010;11:59.
218. Ullmannova V, Haskovec C. The use of housekeeping genes (HKG) as an internal control for the detection of gene expression by quantitative real-time RT-PCR. *Folia Biol (Praha)*. 2003;49(6):211-6.
219. Touchberry CD, Wacker MJ, Richmond SR, Whitman SA, Godard MP. Age-related changes in relative expression of real-time PCR housekeeping genes in human skeletal muscle. *J Biomol Tech*. 2006 Apr;17(2):157-62.
220. Lee PD, Sladek R, Greenwood CM, Hudson TJ. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res*. 2002 Feb;12(2):292-7.
221. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*. 2000 Nov 20;46(1-2):69-81.
222. Huitorel P, Pantaloni D. Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur J Biochem*. 1985 Jul 15;150(2):265-9.
223. Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Oct 15;89(20):9382-5.
224. Goldsworthy SM, Goldsworthy TL, Sprankle CS, Butterworth BE. Variation in expression of genes used for normalization of Northern blots after induction of cell proliferation. *Cell Prolif*. 1993 Nov;26(6):511-8.
225. Hobbs MV, Weigle WO, Noonan DJ, Torbett BE, McEvilly RJ, Koch RJ, et al. Patterns of cytokine gene expression by CD4+ T cells from young and old mice. *J Immunol*. 1993 Apr 15;150(8 Pt 1):3602-14.
226. Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW, Tsay HJ. Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep*. 1998 Mar-Apr;5(2):469-71.

227. Bruns GA, Gerald PS. Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in man-rodent somatic cell hybrids. *Science*. 1976 Apr 2;192(4234):54-6.
228. Sirover MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Jul 13;1432(2):159-84.
229. Nicholls C, Li H, Liu JP. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Aug;39(8):674-9.
230. Chuang DM, Hough C, Senatorov VV. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:269-90.
231. Graven KK, Troxler RF, Kornfeld H, Panchenko MV, Farber HW. Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *J Biol Chem*. 1994 Sep 30;269(39):24446-53.
232. Feldhaus LM, Liedtke AJ. mRNA expression of glycolytic enzymes and glucose transporter proteins in ischemic myocardium with and without reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1998 Nov;30(11):2475-85.
233. Ito Y, Pagano PJ, Tornheim K, Brecher P, Cohen RA. Oxidative stress increases glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels in isolated rabbit aorta. *Am J Physiol*. 1996 Jan;270(1 Pt 2):H81-7.
234. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jun 16;259(3):523-6.
235. Bonafe N, Gilmore-Hebert M, Folk NL, Azodi M, Zhou Y, Chambers SK. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binds to the AU-Rich 3' untranslated region of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) messenger RNA in human ovarian cancer cells: possible role in CSF-1 posttranscriptional regulation and tumor phenotype. *Cancer Res*. 2005 May 1;65(9):3762-71.
236. Nagy E, Rigby WF. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD(+)-binding region (Rossmann fold). *J Biol Chem*. 1995 Feb 10;270(6):2755-63.
237. Nagy E, Henics T, Eckert M, Miseta A, Lightowlers RN, Kellermayer M. Identification of the NAD(+)-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug 28;275(2):253-60.
238. Sundararaj KP, Wood RE, Ponnusamy S, Salas AM, Szulc Z, Bielawska A, et al. Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13;279(7):6152-62.
239. Demarse NA, Ponnusamy S, Spicer EK, Apohan E, Baatz JE, Ogretmen B, et al. Direct binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation. *J Mol Biol*. 2009 Dec 11;394(4):789-803.
240. Phadke MS, Krynetskaia NF, Mishra AK, Krynetskiy E. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase depletion induces cell cycle arrest and resistance to antimetabolites in human carcinoma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Oct;331(1):77-86.
241. Bhatia P, Taylor WR, Greenberg AH, Wright JA. Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal Biochem*. 1994 Jan;216(1):223-6.
242. Desprez PY, Poujol D, Saez S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12.) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: BT-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-(OH)2D3). *Cancer Lett*. 1992 Jul 10;64(3):219-24.
243. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*. 2000 Aug;29(2):332-7.



244. Ishitani R, Kimura M, Sunaga K, Katsube N, Tanaka M, Chuang DM. An antisense oligodeoxynucleotide to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase blocks age-induced apoptosis of mature cerebrocortical neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Jul;278(1):447-54.
245. Ishitani R, Sunaga K, Hirano A, Saunders P, Katsube N, Chuang DM. Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. *J Neurochem*. 1996 Mar;66(3):928-35.
246. Sunaga K, Takahashi H, Chuang DM, Ishitani R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is over-expressed during apoptotic death of neuronal cultures and is recognized by a monoclonal antibody against amyloid plaques from Alzheimer's brain. *Neurosci Lett*. 1995 Nov 17;200(2):133-6.
247. Dastoor Z, Dreyer JL. Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J Cell Sci*. 2001 May;114(Pt 9):1643-53.
248. Shashidharan P, Chalmers-Redman RM, Carlile GW, Rodic V, Gurvich N, Yuen T, et al. Nuclear translocation of GAPDH-GFP fusion protein during apoptosis. *Neuroreport*. 1999 Apr 6;10(5):1149-53.
249. Gong B, Xue J, Yu J, Li H, Hu H, Yen H, et al. Cell-free DNA in blood is a potential diagnostic biomarker of breast cancer. *Oncol Lett*. 2012 Apr 1;3(4):897-900.
250. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 2004 Jul;37(1):112-4, 6, 8-9.
251. Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics*. 2000 Apr 27;2(3):143-7.
252. Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, Hong R, Jensen RV, Misra J, et al. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics*. 2001 Dec 21;7(2):97-104.
253. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet*. 2013 Oct;29(10):569-74.
254. Gong Y, Cui L, Minuk GY. Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28s-ribosomal RNA gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1996 Apr;23(4):734-7.
255. Liu S, Zhu P, Zhang L, Li Z, Lv Q, Zheng S, et al. Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression indicates higher survival rates in male patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Exp Ther Med*. 2015 May;9(5):1597-604.
256. Vila MR, Nicolas A, Morote J, de I, Meseguer A. Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in renal cell carcinoma identified by RNA-based, arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Cancer*. 2000 Jul 1;89(1):152-64.
257. Tokunaga K, Nakamura Y, Sakata K, Fujimori K, Ohkubo M, Sawada K, et al. Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res*. 1987 Nov 1;47(21):5616-9.
258. Revillion F, Pawlowski V, Hornez L, Peyrat JP. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 2000 May;36(8):1038-42.
259. Harada N, Yasunaga R, Higashimura Y, Yamaji R, Fujimoto K, Moss J, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2007 Aug 3;282(31):22651-61.
260. Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S, et al. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2007 Sep;27(9):824-9.

261. Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Dziegiel MH. Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *Prenat Diagn.* 2007 Jan;27(1):6-10.
262. Huang DJ, Mergenthaler-Gatfield S, Hahn S, Holzgreve W, Zhong XY. Isolation of cell-free DNA from maternal plasma using manual and automated systems. *Methods Mol Biol.* 2008;444:203-8.
263. Fong SL, Zhang JT, Lim CK, Eu KW, Liu Y. Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients. *Clin Chem.* 2009 Mar;55(3):587-9.
264. Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, Fersching DM, Leszinski GS, Siegele B, et al. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta.* 2011 Nov 20;412(23-24):2085-8.
265. Repiska G, Sedlackova T, Szemes T, Celec P, Minarik G. Selection of the optimal manual method of cell free fetal DNA isolation from maternal plasma. *Clin Chem Lab Med.* 2013 Jun;51(6):1185-9.
266. Page K, Guttery DS, Zahra N, Primrose L, Elshaw SR, Pringle JH, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PLoS One.* 2013;8(10):e77963.
267. Holmberg RC, Gindlesperger A, Stokes T, Lopez D, Hyman L, Freed M, et al. Akonni TruTip((R)) and Qiagen((R)) methods for extraction of fetal circulating DNA--evaluation by real-time and digital PCR. *PLoS One.* 2013;8(8):e73068.
268. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):3966-8.
269. Zaher ER, Anwar MM, Kohail HM, El-Zoghby SM, Abo-El-Eneen MS. Cell-free DNA concentration and integrity as a screening tool for cancer. *Indian J Cancer.* 2013 Jul-Sep;50(3):175-83.
270. Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, Zucknick M, Nees J, Schott S, et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Jul;146(1):163-74.
271. Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, Dritschilo A, Thierry AR. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2014 Jul;8(5):927-41.
272. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med.* 2012 Jul 1;42(7):565-86.
273. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med.* 1996 Sep;2(9):1035-7.
274. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chasse E, et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2004 Oct 15;22(20):4157-64.
275. Sai S, Ichikawa D, Tomita H, Ikoma D, Tani N, Ikoma H, et al. Quantification of plasma cell-free DNA in patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug;27(4C):2747-51.
276. Spruessel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, et al. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques.* 2004 Jun;36(6):1030-7.
277. David KA, Unger FT, Uhlig P, Juhl H, Moore HM, Compton C, et al. Surgical procedures and postsurgical tissue processing significantly affect expression of genes and EGFR-pathway proteins in colorectal cancer tissue. *Oncotarget.* 2014 Nov 30;5(22):11017-28.
278. Huang J, Qi R, Quackenbush J, Dauway E, Lazaridis E, Yeatman T. Effects of ischemia on gene expression. *J Surg Res.* 2001 Aug;99(2):222-7.

279. Gundisch S, Hauck S, Sarioglu H, Schott C, Viertler C, Kap M, et al. Variability of protein and phosphoprotein levels in clinical tissue specimens during the preanalytical phase. *J Proteome Res.* 2012 Dec 7;11(12):5748-62.
280. Wong SC, Lo SF, Cheung MT, Ng KO, Tse CW, Lai BS, et al. Quantification of plasma beta-catenin mRNA in colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Cancer Res.* 2004 Mar 1;10(5):1613-7.
281. Pucciarelli S, Rampazzo E, Briarava M, Maretto I, Agostini M, Digito M, et al. Telomere-specific reverse transcriptase (hTERT) and cell-free RNA in plasma as predictors of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2012 Sep;19(9):3089-96.
282. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Battaglia L, Sozzi G, et al. Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Sep;1075:185-90.
283. Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H, Coelho A, Nogal A, Sousa A, et al. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA Cell Biol.* 2008 Aug;27(8):415-21.
284. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Kupis W, Maszkowska-Kopij K, Dancewicz M, Kowalewski J, et al. Quantitative analysis of free-circulating DNA in plasma of patients with resectable NSCLC. *Expert Opin Biol Ther.* 2012 Jun;12 Suppl 1:S3-9.
285. Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E, et al. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol.* 1999 Feb;17(2):578-84.
286. Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Oshima S, Aoki T, Higaki N, et al. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 1998 Jun;4(6):1527-32.
287. Ryan BM, Lefort F, McManus R, Daly J, Keeling PW, Weir DG, et al. A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut.* 2003 Jan;52(1):101-8.
288. Clark GM, Osborne CK, Levitt D, Wu F, Kim NW. Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Dec 17;89(24):1874-81.
289. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, et al. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res.* 1995 Aug 1;55(15):3258-62.
290. Marchetti A, Bertacca G, Buttitta F, Chella A, Quattrocchio G, Angeletti CA, et al. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1999 Aug;5(8):2077-81.
291. Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsuura Y, et al. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 Jul;6(7):2696-701.
292. Patel MM, Parekh LJ, Jha FP, Sainger RN, Patel JB, Patel DD, et al. Clinical usefulness of telomerase activation and telomere length in head and neck cancer. *Head Neck.* 2002 Dec;24(12):1060-7.
293. Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, Jantus-Lewintre E, Sanmartin E, Blasco A, et al. Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011 Feb;6(2):286-90.
294. Kang Y, Zhang J, Sun P, Shang J. Circulating cell-free human telomerase reverse transcriptase mRNA in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for gastric cancer. *Int J Clin Oncol.* 2013 Jun;18(3):478-86.
295. Guo C, Liu S, Sun MZ. Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor. *Clin Transl Oncol.* 2013 Mar;15(3):167-72.
296. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, Micard S, Landi B, Blons H, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer.* 2002 Aug 10;100(5):542-8.

297. Gormally E, Hainaut P, Caboux E, Airoidi L, Autrup H, Malaveille C, et al. Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study. *Int J Cancer*. 2004 Sep 20;111(5):746-9.
298. Czeiger D, Shaked G, Eini H, Vered I, Belochitski O, Avriel A, et al. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a new simple fluorescent test in patients with primary colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2011 Feb;135(2):264-70.
299. Ravdin PM, Siminoff LA, Davis GJ, Mercer MB, Hewlett J, Gerson N, et al. Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001 Feb 15;19(4):980-91.

VIII. ANEXOS

 COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE ALBACETE			Nº Hª CLINICA <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
SERVICIO/SECCION:		Nº S.S.:	
Nº CAMA <input type="text"/>	CONSULTA EXT. <input type="text"/>	1º APELLIDO 2º APELLIDO: NOMBRE:	
SERVICIO DE		SEXO <input type="checkbox"/>	EDAD <input type="text"/>
		FECHA <input type="text"/>	
AUTORIZACIÓN PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA BIOBANCO			
<p><i>D/Dña..... D.N.I. nº.....</i></p> <p><i>paciente / representante legal, declara bajo su responsabilidad haber leído y entendido la información sobre la Donación de Muestras Biológicas y haber recibido una copia de dicha información, dando su consentimiento para que se almacene y se utilice una parte de las muestras biológicas sobrantes o muestra adicional obtenida, extraídas durante el proceso asistencial (muestra de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), junto con la información clínica asociada, para proyectos de investigación biomédica, destinados a mejorar el conocimiento de las enfermedades.</i></p> <p><i>Albacete, a..... de..... de..... Firma:</i></p>			
<p><i>Facultativo que proporciona el documento y la explicación al paciente:..... Firma:</i></p>			
<p><i>La investigación para mejorar el conocimiento de la enfermedad que usted padece y de otras enfermedades se ve reforzada si se dispone de muestras procedentes de los pacientes (muestras biológicas humanas). De hecho muchos de los avances científicos de los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.</i></p> <p><i>Si, tras su intervención quirúrgica u otro tipo de proceso asistencial y una vez establecido el diagnóstico de su enfermedad, hay muestras sobrantes de sangre, líquido biológico y/o tejido, estos excedentes podrán conservarse para estudios de investigación biomédica.</i></p> <p><i>Si decide no donar su muestra, esta decisión no va a afectar a la atención y a los cuidados clínicos que usted precise, ni a la relación con el equipo médico que le atiende.</i></p> <p><i>Este consentimiento es voluntario e independiente de su consentimiento para ser intervenido.</i></p> <p><i>Es posible que usted no se beneficie directamente de los resultados, aunque en el futuro sí podrían beneficiarse otras personas con su misma enfermedad u otras relacionadas. Debe usted conocer que no recibirá ningún tipo de compensación por su colaboración, ni económica ni por posibles beneficios comerciales de los descubrimientos conseguidos en la investigación.</i></p> <p><i>Usted o su familia podrán utilizar las muestras almacenadas cuando sea necesario por motivos de salud, siempre y cuando estén disponibles.</i></p> <p><i>Sus muestras y los datos asociados serán custodiados por un establecimiento autorizado, el Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, pasando a formar parte de su archivo, conservándose en un lugar seguro y de acceso restringido al personal del Biobanco, en las condiciones y garantías de calidad que exige la legislación vigente, y bajo la responsabilidad del propio Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.</i></p> <p style="text-align: right;"><i>continúa.../...</i></p>			
DEBERÁ QUEDAR EN LA HISTORIA DEBIDAMENTE CUMPLIMENTADA			
			32

D07.152m

ANEXO I: Documento de consentimiento informado para donación de muestras biológicas para el Biobanco y participación en el presente estudio.

.../... continuación

De producirse un cierre del Biobanco de este centro, estará a su disposición la información del destino de sus muestras en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica, pudiendo manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las mismas.

Sus muestras se identificarán mediante un código, sin hacer referencia a su nombre o a otros datos que permitan identificarle directamente. Toda la información que se obtenga será considerada como confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal.

Sus muestras y datos relacionados con la muestra, podrán utilizarse para cualquier investigación biomédica tanto nacional como internacional en los términos que prescribe la Ley 14/2007, de 3 de julio, y el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, pudiendo ser necesario contactar con usted para recabar datos, solicitarle muestras adicionales u otros motivos justificados pudiendo usted decidir libremente si desea colaborar.

Además tendrá a su disposición toda la información sobre los proyectos en los que se utilice su muestra y los resultados de dichas investigaciones. En determinadas ocasiones el comité de Ética externo del Biobanco o el Comité de Ética de Investigación que evaluó el proyecto podrá decidir si es imprescindible enviarle la información referente a su salud o la de sus familiares derivadas de las investigaciones, pudiendo para ello ponernos en contacto con usted. Si usted expresamente desea recibir la información deberá solicitarlo en el Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

En caso de muestras de menores de edad, éste tendrá acceso a la información cuando alcance la mayoría de edad.

Si decide donar su muestra, usted puede retirar su consentimiento en cualquier momento, procediéndose a la destrucción de las muestras sobrantes o sus materiales derivados y a la retirada de los datos asociados. También puede solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminará la relación entre su material biológico y sus datos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrán extender a las investigaciones anteriores que ya se hubieran llevado a cabo. Para la anulación de su consentimiento deberá solicitarlo en el Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

REVOCACIÓN

D/Dña.....D.N.I. nº.....

Paciente / representante legal, revoco el consentimiento para la DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS prestado en fecha, y deseo que:

☐ se destruyan las muestras sobrantes o sus materiales derivados.

☐ se anonimicen las muestras sobrantes o sus materiales derivados.

En..... (LUGAR Y FECHA)

Fdo. EL DIRECTOR CIENTÍFICO DEL BIOBANCO,

Fdo. EL/LA PACIENTE O

REPRESENTANTE LEGAL.

Para cualquier información puede ponerse en contacto con:

Biobanco Complejo Hospitalario Universitario de Albacete
Unidad de Investigación CHUA (nuevo edificio) planta 3ª
C/ Francisco Javier de Moya, esquina C/ Laurel
02006 Albacete España
Teléfono 967597100 extensión 37068

ANEXO I (cont.): Documento de consentimiento informado para donación de muestras biológicas para el Biobanco y participación en el presente estudio.

ANEXO II: Datos demográficos y anatomoclínicos de los pacientes con cáncer. L: Laringectomía, Faringectomía parcial, VF: vaciamiento cervical funcional unilateral, VFB: vaciamiento cervical funcional bilateral, VR: vaciamiento radical, QUIMIO: quimioterapia, RT: radioterapia.

PACIENTES CON CÁNCER DE LARINGE E HIPOFARINGE. DATOS ANATOMOCLÍNICOS.													
CASOS	SEXO	EDAD	NEOPLASIA PREVIA	TUMOR LOCALIZACIÓN	TRATAMIENTO QX.	TRATAMIENTO CERVICAL	TRATAMIENTO ADYUVANTE	T	N	ESTADIO	RECIDIVA LOCO-REGIONAL	METASTASIS A DISTANCIA	2º TUMOR
1	H	53		SUPRAGLOTIS	L. TOTAL	VR	QUIMIO + RT	T4a	N2b	IVA	SI	SI	
2	H	49		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB		T2	N0	II			PROSTATA
3	H	54		HIPOFARINGE	L. SUPRAGLÓTICA + F. PARC	VFB	RT	T3	N2c	IVA	SI	SI	
4	H	68		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB		T1	N0	I			
5	H	72		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB		T2	N0	I			
6	H	49		SUPRAGLOTIS	L. TOTAL	VFB	QUIMIO + RT	T4a	N1	IVA			
7	H	72	LARINGE	GLOTIS	L. TOTAL	VFB		T4a	N0	IVA			
8	H	68		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB		T3	N0	III			
9	H	54		GLOTIS	L. TOTAL	VFB		T3	N0	III			
10	H	76		SUPRAGLOTIS	L. TOTAL	VFB	RT	T3	N2c	IVA			
11	H	62		GLOTIS	L. TOTAL	VFB	RT	T3	N0	III			
12	H	56		GLOTIS	L. TOTAL	VFB	QUIMIO + RT	T4a	N0	IVA			SUELO DE BOCA
13	H	65		GLOTIS	L. TOTAL	VF		T4a	N0	IVA			
14	H	65		GLOTIS	L. TOTAL	VFB	QUIMIO + RT	T4a	N2c	IVA		SI	
15	H	77		GLOTIS	L. TOTAL	VF	RT	T3	N0	III			L. MIELOIDE AGUDA
16	H	68	MTS. ORIG. DESCONOCIDO	HIPOFARINGE	L. TOTAL + F. PARCIAL	VF	RT	T4a	N1	IVA	SI	SI	
17	H	60		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA + F. PARC	VFB	RT	T2	N2c	IVA	SI	SI	
18	H	61		SUPRAGLOTIS	L. TOTAL	VFB	RT	T4a	N1	IVA			
19	H	88		GLOTIS	L. TOTAL	VFB		T3	N0	III			
20	H	67		SUPRAGLOTIS	L. TOTAL	VFB	RT	T3	N2c	IVA			
21	M	56	LARINGE	SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB		T2	N0	II			
22	H	80		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB	RT	T2	N1	III			
23	H	61		GLOTIS	CORDECTOMIA AMPLIADA LASER	VFB		T2	N0	I			
24	H	49	HIPOFARINGE	SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VF		T2	N0	II			
25	H	80		GLOTIS	CORDECTOMIA LASER	VF		T1	N0	I			
26	H	59		GLOTIS	L. TOTAL	VFB	RT	T1	N0	I			
27	H	63		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA AMPLIAR	VR	QUIMIO + RT	T4a	N0	IVA		SI	
28	H	80		GLOTIS	L. TOTAL	VFB		T3	N2b	IVA			
29	H	55		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA AMPLIAR	VFB	RT	T4a	N0	IVA			
30	H	71	PROSTATA	GLOTIS	L. TOTAL	VFB	QUIMIO + RT	T3	N2c	IVA		SI	
31	H	79		SUPRAGLOTIS	CORDECTOMIA LASER	VFB		T1	N0	I			
32	H	73		GLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB		T3	N0	III			
33	M	54		GLOTIS	CORDECTOMIA LASER	VFB		T1	N0	I			
34	H	60		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB	RT	T3	N0	III			
35	H	52		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VR	QUIMIO + RT	T3	N3	IVB			
36	H	52		GLOTIS	CORDECTOMIA LASER			T3	N0	I	SI		
37	H	75	LINFOMA	SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA LASER			T3	N0	III			
38	H	55		GLOTIS	CORDECTOMIA LASER			T1	N0	I			
39	H	74	CA. UROTETIAL	GLOTIS	CORDECTOMIA LASER	VF	RT	T1	N1	III		SI	
40	H	61		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB	QUIMIO + RT	T1	N1	III			
41	H	58		SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB	RT	T3	N2b	IVA			
42	H	61		GLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA	VFB		T2	N2a	IVA			
43	H	72	LARINGE	SUPRAGLOTIS	L. SUPRAGLÓTICA AMPLIAR	VFB	QUIMIO + RT	T4a	N2b	IVA			
44	H	60		SUPRAGLOTIS	L. TOTAL	VFB	QUIMIO + RT	T3	N2b	IVA			
45	H	73		GLOTIS	L. TOTAL	VFB	RT	T4a	N0	IVA			
46	H	90		GLOTIS	L. TOTAL	VFB	RT	T4a	N0	IVA			
47	H	88	ILEON	GLOTIS	CORDECTOMIA LASER			T1	N0	I			
48	H	77		GLOTIS	L. TOTAL	VFB		T3	N0	III			
49	H	82		GLOTIS	CORDECTOMIA LASER			T1	N0	I			

PACIENTES CON CÁNCER DE LARINGE E HIPOFARINGE. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS MOLECULARES EN PLASMA.										
CASOS	TIEMPO ENTRE MUESTRAS (DÍAS)	MUESTRA PREOPERATORIA DE PLASMA				MUESTRA POSTOPERATORIA DE PLASMA				
		[PreQ-ADN]	[PreQ-GAPDH]	Detección hTERT PreQ.	[preQ-hTERT]	[PostQ-ADN]	[PostQ-GAPDH]	Detección hTERT PostQ.	[postQ-hTERT]	
1	32	37	276,8	SI	0,0003	35,7	13,41	SI	0,0022	
2	33	61,7	0,75			60,2	8,91	SI	0,0115	
3	31	18,7	42,24	SI	0,0037	32,6	4,13	SI	0,0135	
4	31	52	.			80,6	.			
5	79	60,7	.	SI	0,1126	62,2	.			
6	40	42,6	70,72			54,8	58,08			
7	30	77,9	1532,8			76,3	220,8			
8	43	30,8	29,92			51,3	1,24			
9	171	54,7	77,44	SI	0,0269	67,1	9,04			
10	115	22,7	8,3			34,2	3,46			
11	80	57,9	771,2			77,1	68,64			
12	223	35,6	1571,2			55,2	243,2			
13	42	54,1	1904			64,7	288			
14	58	60,8	560			77,8	179,2			
15	120	28,8	444,8			45,6	334,4	SI	0,0971	
16	118	57,3	264			49,5	193,6	SI	1,0224	
17	95	61,5	157,28	SI	2,112	61,6	157,76	SI	0,5584	
18	47	63,5	5,95			62,7	8,1			
19	64	77,4	5,38			84,7	7,58	SI	1,0675	
20	.	.	9,85	SI	1,2425	
21	49	.	50,75	SI	1,3625	.	198,5			
22	34	.	48	SI	4,7	.	91,25	SI	7,525	
23	30	.	43,5			.	100,5			
24	32	.	82,75			.	10,8			
25	30	.	57,5			.	45			
26	29	.	18,78			.	15,55	SI	0,0214	
27	28	.	84	SI	0,3925	.	56,5			
28	29	.	93,5	SI	0,6725	.	100,5	SI	1,1925	
29	31	.	342,5			.	209,5	SI	1,3625	
30	31	.	12325			.	12400			
31	32	.	1525			.	7675			
32	31	.	40			.	29			
33	31	.	252,5			.	342,5	SI	3,025	
34	31	.	480			.	837,5			
35	33	.	20,3			.	25,25			
36	33	.	28,25			.	56,5			
37	30	.	3,85			.	4,55			
38	31	.	4,63			.	5,5			
39	34	.	6,28			.	9,95			
40	30	.	8825	SI	Archivo perdido	.	4900			
41	31	.	18,5			.	12,75			
42	30	.	79,75			.	82,25			
43	29	.	27			.	46,5			
44	31	.	1,4			.	7,5	SI	4,35	
45	32	.	4,08			.	17,38	SI	7,6	
46	34	.	95,75			.	234,5			
47	31	.	1607,5			.	3875			
48	44	.	100			.	45			
49	37	.	3,75			.	28			

ANEXO III: Resultados de los análisis moleculares del plasma de los pacientes con cáncer. [PreQ-ADN]: Concentración de ADN en la muestra de plasma preoperatoria. [PostQ-ADN]: Concentración de ADN en la muestra de plasma postoperatoria, [PreQ-hTERT]: Concentración de hTERT en la muestra de plasma preoperatoria, [PostQ-hTERT]: Concentración de hTERT en la muestra de plasma postoperatoria, [PreQ-GAPDH]: Concentración de GAPDH en la muestra de plasma preoperatoria, [PostQ-GAPDH]: Concentración de GAPDH en la muestra de plasma postoperatoria.

GRUPO CONTROL. RESULTADOS ANÁLISIS MOLECULARES EN PLASMA.				
CASOS	SEXO	EDAD	[GAPDH ARNm] (fg/ml)	[hTERT ARNm]
C1	M	69	40	0
C2	V	48	106,75	0
C3	V	59	119,25	0
C4	V	74	30,5	0
C5	V	65	38,25	0
C6	V	61	62	0
C7	V	69	25,75	0
C8	V	47	0,17	0
C9	V	35	22,13	0
C10	M	60	15,75	0
C11	V	76	15,78	0
C12	V	54	7,75	0
C13	V	56	13,28	0
C14	V	49	5	0
C15	V	70	1,81	0
C16	V	84	9,65	0
C17	V	56	1,41	0
C18	V	73	11	0
C19	M	56	2,07	0
C20	V	38	5,83	0
C21	V	36	3,93	0
C22	V	59	1,34	0
C23	V	64	0,35	0
C24	V	59	0,34	0
C25	V	66	0,78	0
C26	V	76	1,6	0
C27	V	64	0,81	0

ANEXO IV: Datos demográficos y resultados de los análisis moleculares en el plasma del grupo control.
V: varón, M: mujer. [GAPDH ARNm]: concentración plasmática de GAPDH ARNm [hTERT ARNm]:
concentración plasmática de hTERT ARNm.

